

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
13 novembre 2003 (13.11.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/093287 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07H 15/10, 15/04, A61K  
31/70, A61P 37/00, 35/00, C07C 271/22

F-75013 PARIS (FR). GACHELIN, Gabriel [FR/FR]; 54  
rue de Picpus, F-75012 PARIS (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR03/01362

(74) Mandataires : ORES, Béatrice etc.; CABINET ORES,  
36 rue de Saint Petersburg, F-75008 PARIS (FR).

(22) Date de dépôt international : 30 avril 2003 (30.04.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/05557 3 mai 2002 (03.05.2002) FR

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :  
INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25 rue du Docteur  
Roux, F-75015 PARIS (FR). INSTITUT NATIONAL  
DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDI-  
CALE [FR/FR]; 101 rue de Tolbiac, F-75013 PARIS  
(FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75016  
PARIS (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
VO-HOANG, Yen [FR/FR]; 65 rue du Javelot, Tour Mex-  
ico, F-75013 PARIS (FR). BONIN, Martine [FR/FR];  
11 bis allée de l'Etang, F-91190 Gif-sur-yvette (FR).  
MICOIN, Laurent [FR/FR]; 174 rue Jeanne d'Arc,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

WO 03/093287 A1

(54) Title: NOVEL METHOD FOR PREPARING ALPHA-GLYCOSYLCERAMIDES, NOVEL ALPHA-GLYCOSYLCE-  
RAMIDE DERIVATIVES AND THEIR USES

(54) Titre : NOUVEAU PROCEDE DE PREPARATION D'ALPHA-GLYCOSYLCERAMIDES, NOUVEAUX DERIVES AL-  
PHA-GLYCOSYLCERAMIDE ET LEURS APPLICATIONS.

(57) Abstract: The invention concerns novel alpha-glycosylceramide derivatives of general formula (S-I), a method for preparing  
same as well as pharmaceutical compositions comprising same and uses thereof.

(57) Abrégé : L'invention concerne de nouveaux dérivés alpha-glycosylcéramide répondant à la formule générale (S-I), un procédé  
pour leur préparation ainsi que les compositions pharmaceutiques les comprenant et leurs utilisations.

## NOUVEAU PROCÉDÉ DE PRÉPARATION D' $\alpha$ -GLYCOSYLCÉRAMIDES, NOUVEAUX DÉRIVÉS $\alpha$ -GLYCOSYLCÉRAMIDE ET LEURS APPLICATIONS

L'invention se rapporte à de nouveaux composés  
5  $\alpha$ -glycosylcéramide et en particulier à de nouveaux composés  $\alpha$ -galactosylcéramide,  
à un nouveau procédé de préparation de dérivés  $\alpha$ -glycosylcéramide, à des  
compositions pharmaceutiques et à des réactifs biologiques les comprenant, ainsi qu'à  
l'utilisation de ces dérivés comme régulateurs de l'activité des cellules NKT ("Natural  
Killer T cells").

10 Il a été démontré que les cellules NKT sont des effecteurs importants  
dans les mécanismes de contrôle des métastases des tumeurs hépatiques et  
pulmonaires chez la souris (Hashimoto, W. *et al.*, *J. Immunol.*, 154, 4333 (1995));  
Anzai R. *et al.*, *Immunol.*, 88, 82 (1996)). Ces données suggèrent que les cellules NKT  
sont susceptibles de jouer un rôle important dans l'éradication des cancers. Outre cette  
15 activité, on pense aussi qu'elles sont susceptibles de jouer un rôle dans l'éradication  
des parasites, des protozoaires et des infections bactériennes intracellulaires telles que  
*Listeria monocytogenes* et *Mycobacterium tuberculosis* (Seki S. *et al.*, *Clin. Immunol.*,  
28, 1069 (1996)).

On sait également que les cellules NKT sont étroitement associées  
20 au rejet dans les transplantations de moelle osseuse (Yankelevich, B. *et al.*, *J.*  
*Immunol.*, 142, 3423 (1989)) et au contrôle de la production des anticorps IgE par le  
contrôle de la différenciation des cellules T en Th1 et Th2 (Yoshimoto, T. *et al.*, *J.*  
*Exp. Med.*, 179, 1285 (1994)).

Les cellules NKT V $\alpha$ 14+ constituent une sous catégorie des cellules  
25 NKT. Il a été démontré qu'elles étaient étroitement associées à l'apparition de maladies  
auto-immunes chez la souris (Mieza, M.A. *et al.* ; *J. Immunol.*, 156, 4035 (1996);  
Makino, Y. *et al.*, *Clin. Immunol.*, 28, 1487 (1996)). Chez l'homme, il a été montré  
que les cellules V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q $\alpha$ , homologues des cellules NKT V $\alpha$ 14+ de la souris, sont  
impliquées dans différentes maladies auto-immunes telles que la sclérose en plaques,  
30 le lupus érythémateux (Sumida, T. *et al.*, *J. Exp. Med.*, 182, 1163 (1995) ou le diabète  
auto-immun (SHARIF S. *et al.*, *Nature Medecine*, 2001, 7, 1057-1062). Ces données

confirment le rôle de pivot joué par ces cellules dans l'homéostasie du système immunitaire.

Des composés extraits d'éponges (famille des agélasphines) ont été isolés en 1993 par une équipe japonaise puis testés. Certains de ces dérivés ont été  
5 sélectionnés pour leurs activités antitumorales et immunorégulatrices (T. Natori, Y. Koezuka; T. Higa, *Tetrahedron Lett.*, 1993, 34, 5591 ; EP-0 609 437). Des analogues ont ensuite été synthétisés et testés par ces auteurs (M. Morita, K. Motoki, K. Akimoto, T. Natori, T. Sakai, E. Sawa, K. Yamaji, Y. Koezuka, E. Kobayashi, H. Kukushima, *J. Med. Chem.*, 1995, 38, 2176 ; H. Iijima, K. Kimura, T. Sakai, A.  
10 Ichimura, T. Shimizu, H. Ueno, T. Natori, Y. Koezuka, *Bioorg. Med. Chem.*, 1998, 6, 1905 ; US-5,849,716 ; US-5,780,441 ; EP-0 666 268 ; US-5,936,076 ; EP-0 694 558). Des propriétés anti-tumorales, immunostimulantes ont été décrites pour ces composés. Certains ont été testés pour leurs propriétés radio-protectrices, et pour le traitement des maladies dues à la destruction ou à l'affaiblissement des cellules de la moelle  
15 osseuse et pour le traitement de la thrombocytopénie (EP-650-0 650 732 ; US-6,017,892 ; US-6,071,884).

Ces molécules de type  $\alpha$ -galactosylcéramide interagissent avec un complexe majeur d'histocompatibilité de type CD1d permettant le recrutement et la prolifération de lymphocytes NKT (Z.H. Zeng, A.R. Castano, B.W. Segelke, E.A.  
20 Stura, P.A. Peterson, I.A. Wilson, *Science*, 1997, 277, 339). Ils sont remarquables par leur qualité d'outils biologiques potentiels permettant de décrypter et contrôler les réponses immunitaires.

Des dérivés de type  $\alpha$ -galactosylcéramide ont été synthétisés et décrits, notamment dans, EP-0 988 860, et il a été démontré qu'ils stimulaient l'activité  
25 cytotoxique anti-cancéreuse des cellules NKT, qu'ils prévenaient l'apparition de l'encéphalomyélite auto-immune chez la souris et du diabète chez la souris Nod. Certains dérivés de type  $\alpha$ -galactosylcéramide ont un effet thérapeutique sur les maladies virales, notamment le SIDA, l'hépatite B, les infections à cytomégalovirus (voir notamment la demande de brevet EP-A-0 957 161).

30 Toutefois, les composés décrits dans l'art antérieur ont été obtenus par des voies de synthèse longues et difficiles. L'obtention de molécules optiquement actives comportant plusieurs carbones asymétriques et plusieurs fonctionnalités

réactives sur la même molécule rend la synthèse de ces composés compliquée et difficilement rationalisable.

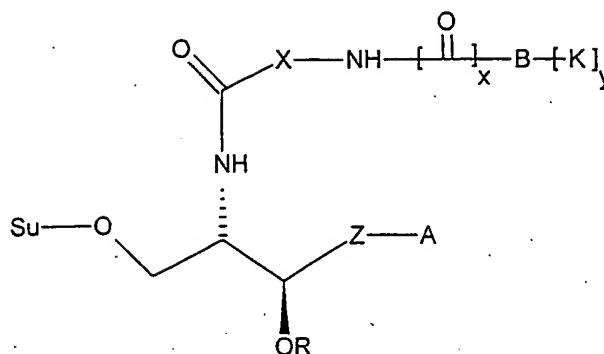
Les auteurs de la présente invention se sont donnés pour objectif la conception et la mise au point d'une nouvelle voie de synthèse de dérivés  $\alpha$ -glycosylcéramide, en particulier de dérivés  $\alpha$ -galactosylcéramide, cette voie de  
5 synthèse permettant, à partir d'un même intermédiaire, d'aboutir à des molécules aux fonctionnalités variées, notamment des molécules susceptibles de servir de marqueur dans des tests d'activité biologique. Cet intermédiaire possède la structure de base caractéristique des  $\alpha$ -glycosylcéramides, en particulier des  $\alpha$ -galactosylcéramides et il  
10 est en outre doté d'un résidu amine sur lequel peuvent être greffés des fragments fonctionnels variés. La voie de synthèse proposée permet donc de préparer, par un seul procédé, un intermédiaire  $\alpha$ -glycosylcéramide aminé, en particulier  $\alpha$ -galactosylcéramide aminé, et de le décliner ensuite en de multiples molécules à l'issue d'une ou de deux étapes de synthèse supplémentaire. Cette voie de synthèse présente  
15 donc l'avantage d'être extrêmement rationnelle, et donc plus facilement extrapolable à une grande échelle, économique. En outre, elle permet d'accéder à des molécules nouvelles, susceptibles d'être utilisées pour leurs propriétés immunorégulatrices, anti-infectieuses, anti-tumorales, anti-diabétiques. Cette voie de synthèse permet d'utiliser tout sucre dans la partie glycosidique de la molécule, tel que par exemple l' $\alpha$ -  
20 galactose, l' $\alpha$ -glucose, l' $\alpha$ -mannose et leurs dérivés. De plus, cette voie de synthèse permet de réaliser des mono- ou des di- $\alpha$ -glycosylcéramides, les sucres utilisés pour un di-glycosylcéramide étant identiques ou différents.

La présente Invention a pour objet de nouveaux dérivés  $\alpha$ -glycosylcéramide répondant à la formule générale (S-I) :

25

30

35



5

dans laquelle :

- Su représente un résidu glycoside qui peut, par exemple, être choisi parmi le glucose, le mannose, le galactose et certains dérivés de glycoside ;
- 10 - X représente un radical alcane di-yle en C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, linéaire ou ramifié, ou un groupement aryle ;
- x est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- y est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- A représente un atome d'hydrogène ; un groupement alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, linéaire ou ramifié, ou un groupement aryle ;
- 15 - Z représente -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- ou -CH=CH- ;
- R représente un atome d'hydrogène ou un résidu glycoside qui peut, par exemple, être choisi parmi le glucose, le mannose, le galactose et leurs dérivés ; R peut être identique ou différent du radical Su ;
- 20 - B représente un groupement choisi parmi : un atome d'hydrogène, et alors x=y=0 ; B peut également représenter une simple liaison, un radical alkyle, alcényle ou alcynyle en C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, linéaire, ramifié ou cyclique, éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements -OH, -NH<sub>2</sub>, halogène, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, par un groupement aryle éventuellement substitué ou un groupement hétéroaryle, par un
- 25 hétérocycle comprenant de 5 à 10 chaînons et un ou plusieurs hétéro atomes choisis parmi O, N, S ; B peut être un groupement aryle éventuellement substitué ou un groupement hétéroaryle, un hétérocycle comprenant de 5 à 10 chaînons et

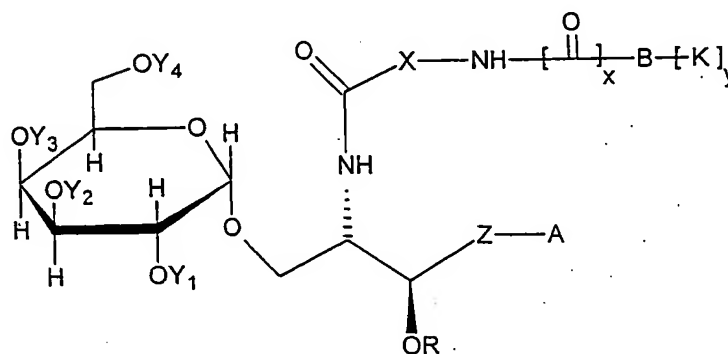
un ou plusieurs hétéro atomes choisis parmi O, N, S ; B peut aussi représenter une chaîne peptidique ou pseudopeptidique comprenant par exemple de 2 à 20 acides aminés, de préférence de 2 à 10 acides aminés ;

- 5 - K représente un groupement pharmacophore, tel qu'un groupement fluorescent, un groupement photoactivable, un groupement radiomarké ou tout autre groupement permettant la détection et l'évaluation quantitative du produit répondant à la formule (I) dans un échantillon biologique sans dégradation de l'échantillon biologique.

- 10 Parmi les dérivés de glycoside représentés par le symbole Su, on désigne en particulier les glycosides, tels que par exemple le galactose, le glucose, le mannose, dont les fonctions hydroxyles sont protégées, notamment par des groupements protecteurs des sucres traditionnellement employés tels que les résidus acétyl, benzyle etc... On désigne également les composés di-glycoside et polyglycoside, protégés ou non sur leurs fonctions hydroxyle. Préférentiellement, les
- 15 glycoside et dérivés de glycoside employés dans la présente invention sont des molécules de configuration  $\alpha$ .

Dans une mise en œuvre préférée, la présente Invention a pour objet de nouveaux dérivés  $\alpha$ -galactosylcéramide répondant à la formule générale (I) :

20

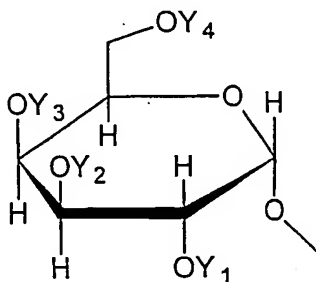


(I)

dans laquelle :

- 25 -  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  et  $Y_4$  représentent un atome d'hydrogène, un groupement benzyle ou un monosaccharide qui peut par exemple être choisi parmi le glucose, le mannose, le galactose, le fucose, la glucosamine et la galactosamine ;

- X représente un radical alcane di-yle en  $C_1-C_{30}$ , linéaire ou ramifié, ou un groupement aryle ;
- x est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- y est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- 5 - A représente un atome d'hydrogène ; un groupement alkyle en  $C_1-C_{20}$ , linéaire ou ramifié, ou un groupement aryle ;
- Z représente  $-CH_2-CH_2-$  ou  $-CH=CH-$  ;
- R représente un atome d'hydrogène ou un radical  $\alpha$ -galactosyle répondant à la formule (II) ci-dessous :



10

(II)

dans laquelle  $Y_1, Y_2, Y_3, Y_4$  ont les mêmes définitions que celles indiquées ci-dessus dans la formule (I) ;

- B représente un groupement choisi parmi : un atome d'hydrogène, et alors  $x=y=0$  ;
- 15 B peut également représenter une simple liaison, un radical alkyle, alcényle ou alcynyle en  $C_1-C_{30}$ , linéaire, ramifié ou cyclique, éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements  $-OH$ ,  $-NH_2$ , halogène,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ , par un groupement aryle éventuellement substitué ou un groupement hétéroaryle, par un hétérocycle comprenant de 5 à 10 chaînons et un ou plusieurs hétéro atomes
- 20 choisis parmi O, N, S ; B peut être un groupement aryle éventuellement substitué ou un groupement hétéroaryle, un hétérocycle comprenant de 5 à 10 chaînons et un ou plusieurs hétéro atomes choisis parmi O, N, S ; B peut aussi représenter une chaîne peptidique ou pseudopeptidique comprenant, par exemple, de 2 à 20 acides aminés, de préférence de 2 à 10 acides aminés ;
- 25 - K représente un groupement pharmacophore, tel qu'un groupement fluorescent, un groupement photoactivable, un groupement radiomarqué ou tout autre groupement



permettant la détection et l'évaluation quantitative du produit répondant à la formule (I) dans un échantillon biologique sans dégradation de l'échantillon biologique.

Parmi les groupements pharmacophores utilisables au sens de la présente invention, on peut notamment citer : le composé fluorescent connu sous le nom commercial de BODIPY® (Boron Dipyrromethene difluoride ou dipyrrométhène difluorure de bore, vendu par la société Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), le nitrobenzoxadiazole (NBD, les groupements à fonction azirine, les groupements hétérocycliques iodés, les groupements radioactifs ainsi que les groupements dansyle.

Par halogène, on entend au sens de la présente invention un atome choisi de préférence parmi le fluor, le chlore, le brome, l'iode.

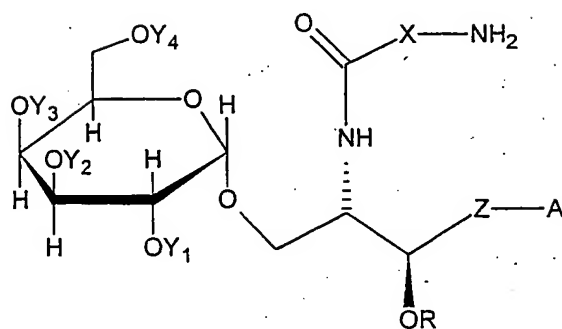
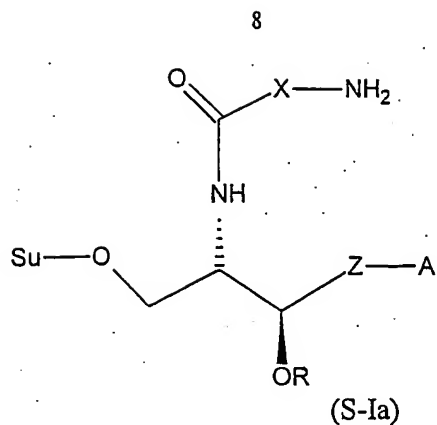
Par aryle, on entend au sens de la présente invention un dérivé hydrogénocarboné cyclique insaturé, tel qu'un radical phényle par exemple, ce dérivé étant éventuellement substitué par un ou plusieurs radicaux alkyle, alcényle, alcynyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halogénoalkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, halogène, -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH ou -CONH<sub>2</sub>.

Parmi les groupements hétéroaryles utilisables au sens de la présente invention, on peut citer par exemple les groupements pyridine, pyrimidine, imidazole, indole, thiazole, thiophène, oxazole, carboline et quinoline.

Parmi les hétérocycles comprenant de 5 à 10 chaînons et un ou plusieurs hétéro atomes choisis parmi O, N, S, utilisables dans la présente invention, on peut citer par exemple les groupements pipérazine, morpholine, oxazolidine, thiazolidine et quinolizidine.

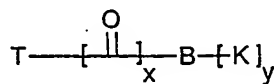
Selon une première variante de l'invention, la molécule répondant à la formule (S-I) ou à la formule (I) se caractérise en ce que :  $x=y=0$  et  $B=H$ .

La molécule ainsi obtenue, et dans laquelle les autres paramètres ont la même définition que ci-dessus peut être représentée par la formule (S-Ia) ou respectivement par la formule (Ia) ci-dessous :



5

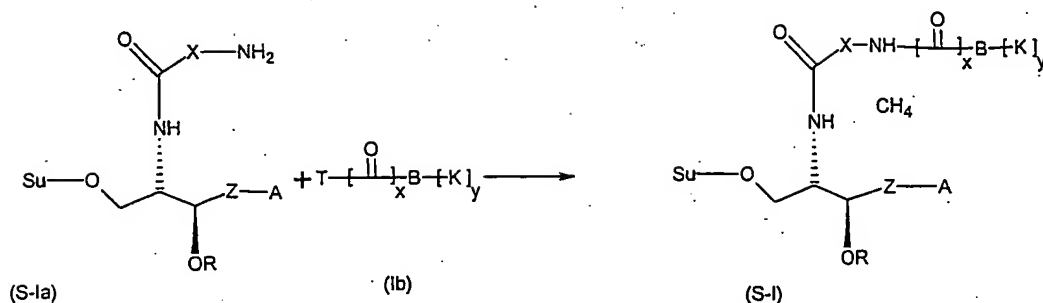
Conformément à l'invention, les molécules répondant à la formule (S-I) ou plus particulièrement (I) dans laquelle  $x=1$  ou  $y=1$ , et  $B \neq H$  sont obtenues par un procédé caractérisé en ce que l'on fait réagir le composé (S-Ia), respectivement (Ia), avec un composé répondant à la formule (Ib) ci-dessous :



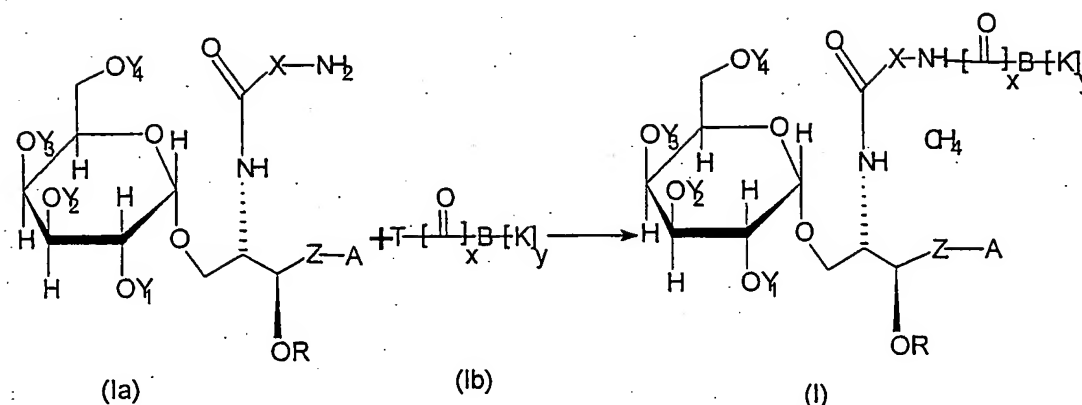
(Ib)

suivant le schéma S-E, respectivement E, ci-dessous :

15

Schéma S-E

5

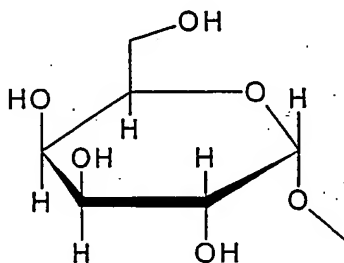
Schéma E

Dans la formule (Ib), x, y, B et K ont la même définition que ci-dessus et T est choisi pour réaliser l'alkylation (x=0) ou l'acylation (x=1) de la fonction amine libre de (S-Ia), respectivement (Ia).

De telles réactions sont bien connues de l'homme du métier. Dans le cas où x=1, on peut notamment se reporter à J. March, *Advanced Organic Chemistry*, Third Edition, 1985, 370-377. L'acylation de la fonction amine de (Ia) peut de façon connue être faite par réaction avec un acide activé sous forme de chlorure d'acide, d'amide, d'ester activé ou d'anhydride. Des exemples de réalisation seront donnés ultérieurement dans la description. Dans le cas où x=0, on peut se reporter à J. March, pré-cité, pages 798-800 (alkylation réductrice d'amines).

De préférence, dans la formule (S-I), respectivement (I), et dans les formules (S-Ia) et (Ia) ci-dessus l'une ou plusieurs des conditions ci-dessous sont remplies :

- $Y_1, Y_2, Y_3$  et  $Y_4$  représentent l'atome d'hydrogène
- 5 - X représente un radical alcane di-yle en  $C_6-C_{15}$ , linéaire ou ramifié ou un groupement aryle ;
- x est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- y est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- A représente : un groupement alkyle en  $C_4-C_{15}$ , linéaire ou ramifié ou un
- 10 - groupement aryle ;
- Z représente  $-CH_2-CH_2-$  ou  $-CH=CH-$  ;
- R représente un atome d'hydrogène ou un radical  $\alpha$ -galactosyle :

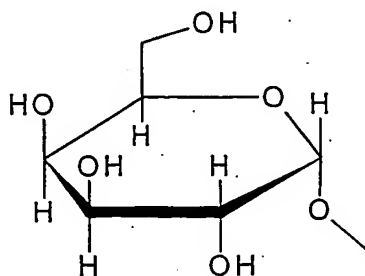


- B représente un groupement choisi parmi : l'atome d'hydrogène, et alors  $x=y=0$ , ou
- 15 - B représente un groupement alkyle ou alcényle en  $C_1-C_{12}$ , linéaire ou ramifié,
- K représente un groupement pharmacophore, tel qu'un groupement fluorescent, un groupement photoactivable, un groupement radiomarké choisi parmi : le BODIPY®, le NBD, les groupements à fonction azirine, les groupements hétérocycliques iodés, les groupements radioactifs ainsi que les groupements
- 20 - dansyle.

De manière particulièrement préférée dans la formule (S-I), respectivement (I), ou la formule (S-Ia), respectivement (Ia) l'une ou plusieurs des conditions ci-dessous sont remplies :

- $Y_1, Y_2, Y_3$  et  $Y_4$  représentent l'atome d'hydrogène
- 25 - X représente un radical alcane di-yle en  $C_6-C_{15}$ , linéaire ou ramifié ;
- x est un entier égal à 0 ou à 1 ;

- y est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- A représente : un groupement alkyle en C<sub>4</sub>-C<sub>15</sub>, linéaire ou ramifié ;
- Z représente -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- ou -CH=CH-;
- R représente un atome d'hydrogène ou un radical α-galactosyle :



5

- B représente un groupement choisi parmi : un atome d'hydrogène et alors  $x=y=0$ , ou B représente un groupement alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, linéaire ou ramifié ;
- lorsque B  $\neq$  H, K représente un groupement BODIPY®.

10      Encore plus préférentiellement, au sens de la présente invention, les produits de formule (S-I), respectivement (I), ou (S-Ia) ou (Ia), se caractérisent en ce que l'une ou plusieurs des conditions ci-dessous sont remplies :

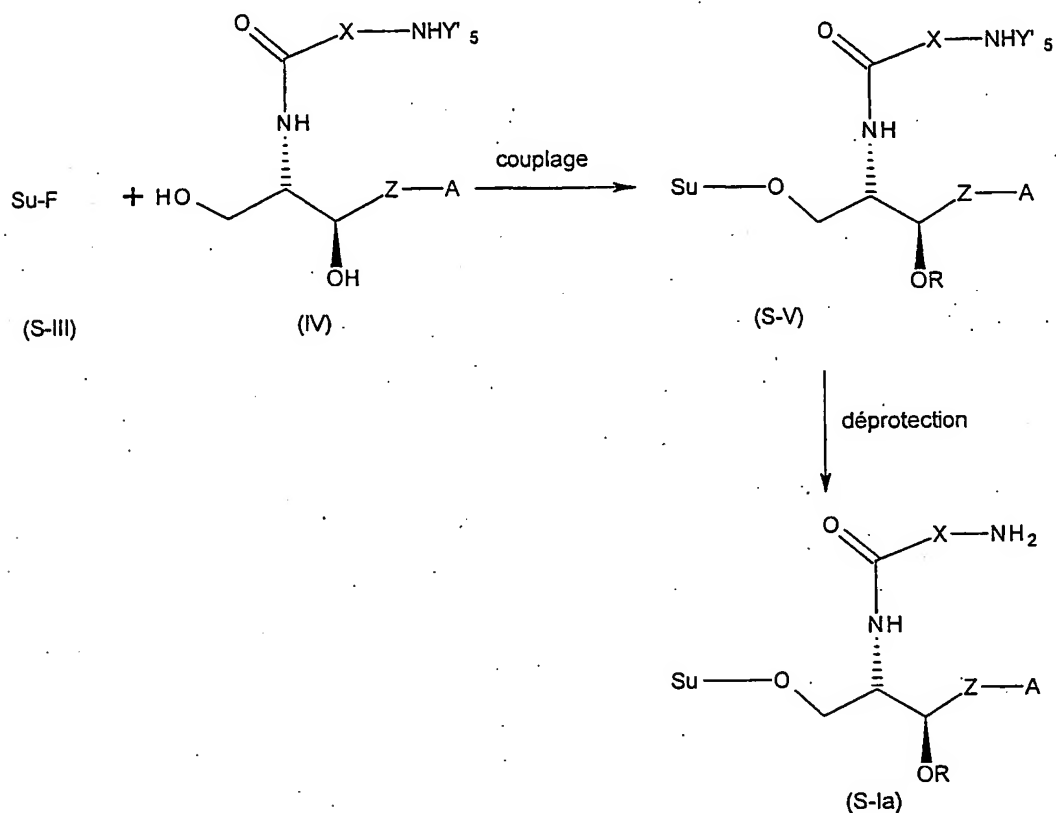
- Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub> et Y<sub>4</sub> représentent l'atome d'hydrogène,
- X représente un radical alcane diyle linéaire en C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub> ;
- x est égal à 1 ;
- 15      - y est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- A représente un groupement alkyle linéaire en C<sub>10</sub>-C<sub>15</sub> ;
- Z représente -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- ;
- R représente un atome d'hydrogène ;
- B représente un groupement choisi parmi : un atome d'hydrogène, et alors  $x=y=0$ ,
- 20      un groupement alkyle linéaire en C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> ;
- lorsque B  $\neq$  H, K représente un groupement BODIPY®.

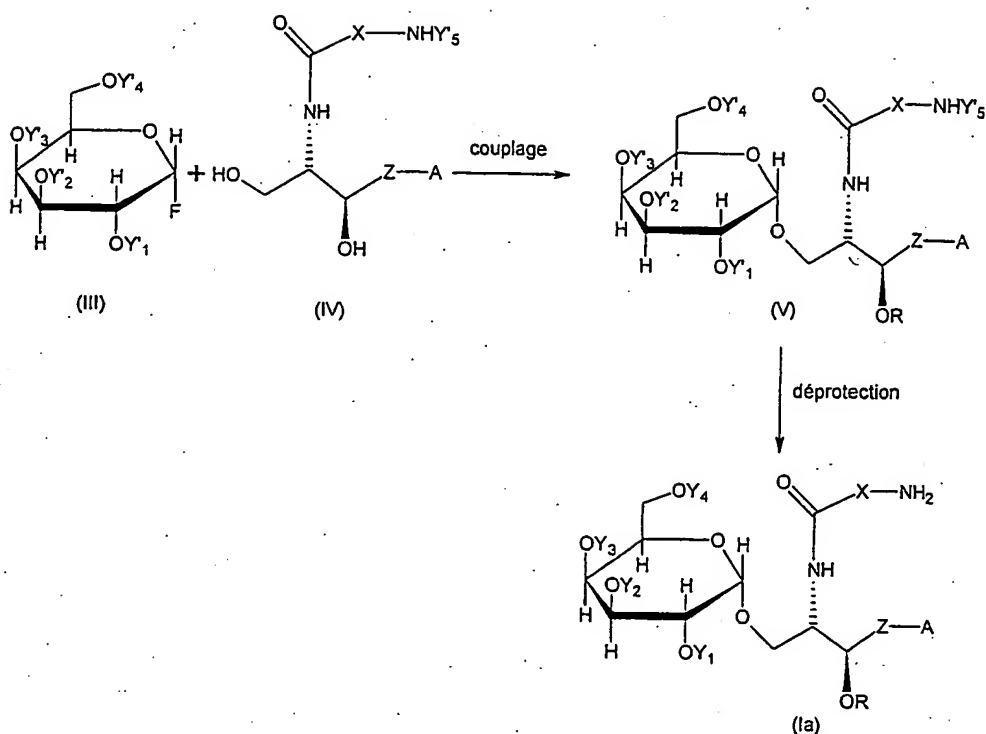
Dans le cas où K représente un groupement BODIPY®, celui-ci est couplé à (S-Ia) ou à (Ia) en faisant réagir un ester activé de BODIPY® avec (S-Ia) ou (Ia), notamment l'ester de N-hydroxysuccinimide.

25

L'invention a également pour objet un procédé de préparation des molécules répondant à la formule (S-I), respectivement (I).

Le procédé selon l'invention se décompose en plusieurs étapes distinctes, l'une de ces étapes consistant à préparer un produit selon la formule (Ia), ce procédé comportant au moins une étape (étape de couplage dans le schéma S-D ou D) au cours de laquelle on fait réagir un glycoside (S-III), respectivement un  $\alpha$ -galactoside (III), avec un céramide (IV) puis une étape de déprotection des groupements fonctionnels :



Schéma D

5

Dans la formule (III) :

- $Y'_1$ ,  $Y'_2$ ,  $Y'_3$  et  $Y'_4$  représentent un groupement protecteur des hydroxyle ou un monosaccharide protégé par des groupements protecteurs appropriés de façon à ce que les hydroxyle du galactoside (III) n'interviennent pas dans la réaction de couplage avec le céramide (IV). De façon connue,  $Y'_1$ ,  $Y'_2$ ,  $Y'_3$ ,  $Y'_4$  peuvent être choisis parmi les groupements benzyle, acétyle ou les monosaccharides benzylés, acétylés ....La même stratégie peut être envisagée pour le résidu glycosyle désigné Su dans la formule (S-III).

15

Dans la formule (IV) :

- $Y'_5$  représente un groupement protecteur des amines de façon à ce que l'amine du céramide (IV) n'intervienne pas dans la réaction de couplage avec le glycoside (S-III), respectivement le galactoside (III). De façon connue,  $Y'_5$  peut être choisi parmi les groupements benzyloxycarbonyle, terbutyloxycarbonyle.....;
- Z représente le groupement  $-\text{CH}=\text{CH}-$  ou  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  ;

- X et A ont la même définition que dans la formule (S-I), respectivement (I). Lorsque X ou A comportent un groupe fonctionnel susceptible de réagir au cours de la réaction de couplage du galactoside avec le céramide, celui-ci est protégé par un groupe protecteur approprié.

5 De préférence les groupes protecteurs du galactoside, Y'<sub>1</sub>, Y'<sub>2</sub>, Y'<sub>3</sub>, Y'<sub>4</sub>, et du céramide, Y'<sub>5</sub>, sont choisis de façon à pouvoir être ôtés simultanément en une seule étape. Lorsque la molécule (IV) ne comporte pas d'insaturations, on choisit de préférence des groupes protecteurs susceptibles d'être ôtés par hydrogénation en présence d'un catalyseur approprié, comme les groupements benzyle et benzyloxycarbonyle. Lorsque la molécule (IV) comporte une ou plusieurs  
10 insaturations que l'on désire conserver dans le composé final (S-I) ou (I), on choisit des groupes protecteurs qui peuvent être ôtés sans porter atteinte à l'intégrité de la molécule, tels que par exemple : le groupement acétyle.

Dans les formules (S-V) et (V) :

15 - Z représente le groupement  $-\text{CH}=\text{CH}-$  ou  $-\text{CH}_2=\text{CH}_2-$  ;  
- X, R et A ont la même définition que dans les formules (S-I) et (I) ci-dessus ;

- Y'<sub>1</sub>, Y'<sub>2</sub>, Y'<sub>3</sub>, Y'<sub>4</sub>, représentent, comme dans la formule (III), un groupement protecteur des hydroxyles ou un monosaccharide protégé par des groupements protecteurs appropriés ;  
20

- Y'<sub>5</sub> représente, comme dans la formule (IV) ci-dessus un groupement protecteur des amines.

Lorsque R=H, on réalise le couplage du galactoside (III) (ou du glycoside (S-III)) et du céramide (IV) avec un mélange en quantités équimolaires du galactoside (III) (ou du glycoside (S-III)) et du céramide (IV). Lorsque R représente  
25 un radical  $\alpha$ -galactosyle, la réaction est faite en introduisant une quantité molaire au moins double de galactoside (III) par rapport au céramide (IV).

De façon avantageuse, le couplage du glycoside (S-III) ou du galactoside (III) avec le céramide (IV) est fait dans des conditions décrites par  
30 Mukayama *et al.*, Chem. Lett., 1981, 431-432, en présence de  $\text{AgClO}_4$  et  $\text{SnCl}_2$ . De façon préférentielle, la réaction se fait dans un mélange de tétrahydrofurane (THF) et



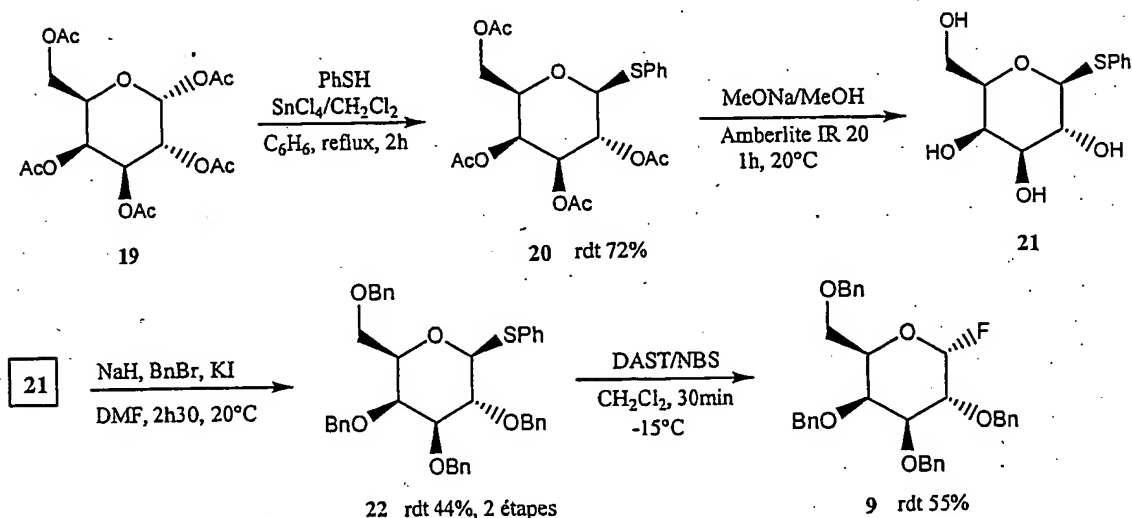
d'éther diéthylique. On constate par analyse RMN que la configuration du cycle glycosidique est conforme à ce qui était attendu.

Dans les formules (S-Ia) et (Ia) :

les groupements Su, Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>, Y<sub>4</sub>, X, R, Z et A ont la même  
5 définition que dans les formules (S-I), respectivement (I).

Les composés répondant à la formule (III) sont connus dans l'art antérieur, leur mode de préparation a été décrit, notamment par K. L. Nicolaou, R. E. Dolle, P. P. Papahatjis, (*J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106, 4189 et références citées).

Dans le cas où Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub> et Y<sub>4</sub> représentent un groupement  
10 benzyle, le schéma de synthèse est le suivant (schéma C) :



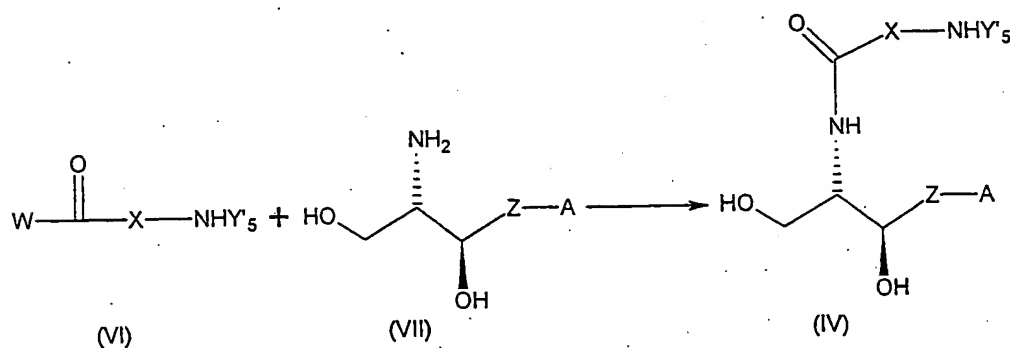
### Schéma C

15 Dans ce schéma, les abréviations DAST et NBS signifient respectivement : DiethylAminoSulfurTrifluoride et N-BromoSuccinimide (Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis, Ed : Paquette, 1995, JohnWiley & sons, Ltd, p.1787 et 768). Dans le cas où l'on souhaite obtenir le composé α-galactoside 6-fluoré peracétylé, on procède de la même façon que ci-dessus en  
20 supprimant les étapes de désacétylation et de benzylation.

Dans le cas des produits de formule (S-I), l'homme du métier saura adapter la préparation du dérivé fluoré au cycle glycosidique concerné.

Dans les cas où l'un ou plusieurs des substituants  $Y'_1$ ,  $Y'_2$ ,  $Y'_3$  et  $Y'_4$  représentent un groupement monosaccharide benzylé ou acétylé, on procède de la même façon.

Les produits répondant à la formule (IV) ont été préparés par un procédé caractérisé en ce que l'on fait réagir un dérivé activé (VI) avec un analogue ou un dérivé de la D-érythro-sphingosine (VII) ou avec la D-érythro-sphingosine elle-même suivant le schéma B ci-dessous :



10

### Schéma B

Dans la molécule (VI), le groupement X a la même signification que dans la formule (I).  $Y'_5$  a la même signification que dans la formule (IV) et représente un groupement protecteur des amines de façon à ce que l'amine de (VI) ne réagisse pas dans la réaction avec le composé (VII) et que l'amine du céramide (IV) n'intervienne pas dans la réaction de couplage avec le galactoside (III).  $Y'_5$  peut être choisie parmi les groupements benzyloxycarbonyle, terbutyloxycarbonyle.....

Le dérivé activé (VI) peut être un chlorure d'acide, un ester ou un amide. Préférentiellement, c'est un ester activé, tel que par exemple un ester de paranitrophényl. W représente tout groupe activateur tel que décrit par exemple dans Protective Groups in Organic Synthesis, T.W. Green, P.G.M., Wuts, 3<sup>ème</sup> Ed., 1999, JohnWiley & sons, Ltd. De préférence, W est choisi parmi les groupements nitrophényle et les esters activés de succinimidyle. Des composés répondant à la formule (VI) peuvent être aisément préparés par des méthodes bien connues de l'homme du métier, ce sont des composés comprenant une fonction amine protégée et une fonction acide activée, ainsi qu'éventuellement une ou plusieurs autres fonctions

20

25

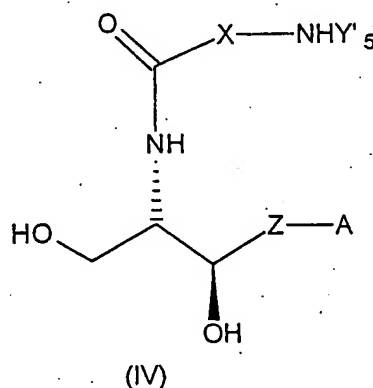
qui ne doivent pas intervenir dans la réaction de couplage avec (VII). Pour la préparation de telles molécules, on pourra se référer aux ouvrages concernant la chimie des acides aminés, notamment aux chapitres concernant la protection, la déprotection et l'activation des groupes fonctionnels. La préparation de composés

5 répondant à la formule (VI) est illustrée plus loin dans la description.

Dans la molécule (VII), A a la même définition que dans la formule (I), Z représente le groupement  $-\text{CH}=\text{CH}-$ .

Le composé répondant à la formule (IV) ci-dessous, dans laquelle Z et A ont la même définition que dans la formule (I) et  $\text{Y}'_5$  représente un groupement

10 choisi parmi l'atome d'hydrogène et les groupements protecteurs des amines, constitue un autre objet de l'invention :



Selon l'invention :

- A représente : un atome d'hydrogène ; un groupement alkyle en  $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ , linéaire ou ramifié, ou un groupement aryle ;
  - X représente un radical alcane di-yle, en  $\text{C}_1\text{-C}_{30}$ , linéaire ou ramifié, ou un groupement aryle ;
  - Z représente  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$  ou  $-\text{CH}=\text{CH}-$  ;
  - $\text{Y}'_5$  est choisi parmi : l'atome d'hydrogène, un groupement benzyloxycarbonyle, un groupement ter butyloxycarbonyle.
- 15
- 20

De préférence :

- A représente : un groupement alkyle en  $\text{C}_4\text{-C}_{15}$ , linéaire ou ramifié, ou un groupement aryle ;
- X représente un radical alcane di-yle en  $\text{C}_6\text{-C}_{15}$ , linéaire ou ramifié ;

- Z représente  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  ou  $-\text{CH}=\text{CH}-$  ;
- $\text{Y}'_5$  est choisi parmi : l'atome d'hydrogène, un groupement benzyloxycarbonyle.

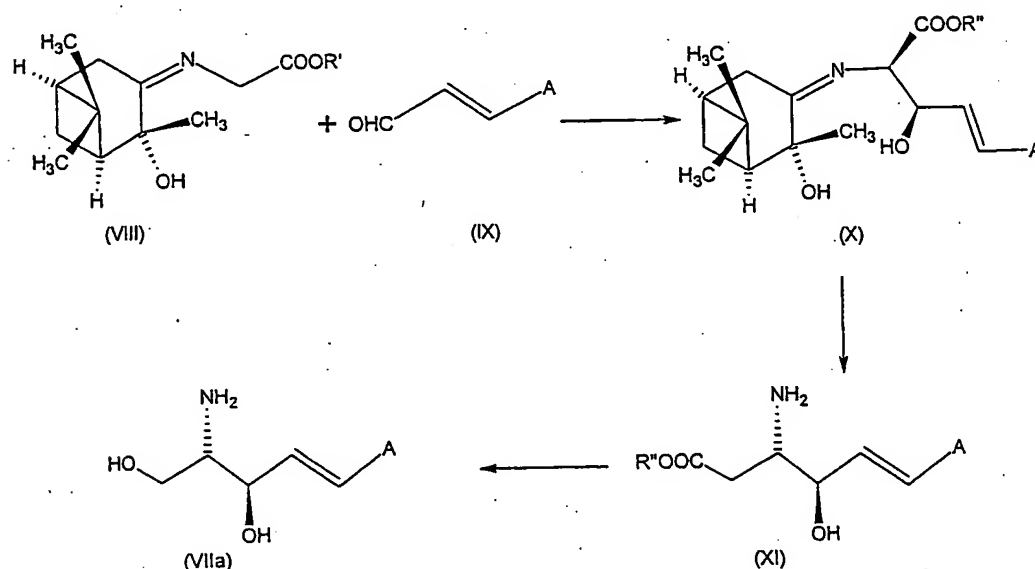
Encore plus préférentiellement :

- A représente : un groupement alkyle en  $\text{C}_4-\text{C}_{15}$ , linéaire ou ramifié ;
- 5 - X représente un radical alcane di-yle en  $\text{C}_6-\text{C}_{15}$ , linéaire ou ramifié ;
- Z représente  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  ou  $-\text{CH}=\text{CH}-$  ;
- $\text{Y}'_5$  est choisi parmi : l'atome d'hydrogène, un groupement benzyloxycarbonyle.

Avantageusement :

- A représente : un groupement alkyle linéaire en  $\text{C}_{10}-\text{C}_{15}$  ;
- 10 - X représente un radical alcane di-yle linéaire en  $\text{C}_6-\text{C}_{15}$  ;
- Z représente  $-\text{CH}=\text{CH}-$  ;
- $\text{Y}'_5$  représente un groupement benzyloxycarbonyle.

Le composé (VIIa) (composé (VII) avec  $\text{Z} = -\text{CH}=\text{CH}-$ ) est obtenu par une voie de synthèse qui est décrite dans le schéma A ci-dessous :



15

### Schéma A

Dans ce schéma A,  $\text{R}'$  représente un radical éthyle et  $\text{R}''$  représente un radical éthyle ou isopropyle.

- 20 L'iminoester (VIII) dérivant de la (+)-hydroxypinanone est condensé avec l'aldéhyde (IX) via une réaction d'aldolisation pour donner le composé (X). En fonction du réactif employé pour la réaction d'aldolisation (Solladié-Cavallo *et al.*, J.

Org. Chem., 1994, 59, 3240-3242), on peut obtenir un mélange d'esters, ce qui est sans importance pour la suite puisque la fonction acide est déprotégée deux étapes plus loin.

De façon préférentielle, on a utilisé le réactif  $\text{ClTi}(\text{OiPr})_3$  associé à de la triéthylamine, système qui donne de meilleurs rendements que le  $\text{ClTi}(\text{OEt})_3$  et donne le mélange d'esters éthylique et propylique (X) dans un ratio 7/3.

L'imine (X) est ensuite hydrolysée en amine (XI) et la fonction ester de (XI) est réduite en alcool (VII). La réaction d'hydrolyse est faite de façon connue en milieu acide, de préférence en milieu acide dilué.

La réaction de réduction de l'ester (XI) en alcool (VII) se fait en présence d'un hydruire mixte, de préférence de lithium et de bore.

Le composé répondant à la formule (VIII) est préparé suivant un procédé résumé dans le schéma de synthèse F ci-dessous et dans lequel  $\text{R}'$  a la même signification que celle indiquée ci-dessus dans le schéma A :

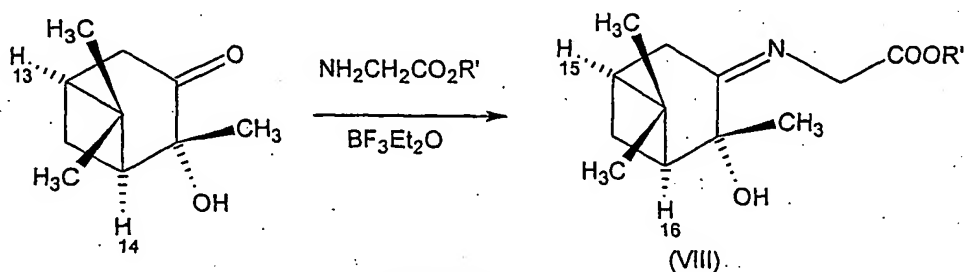
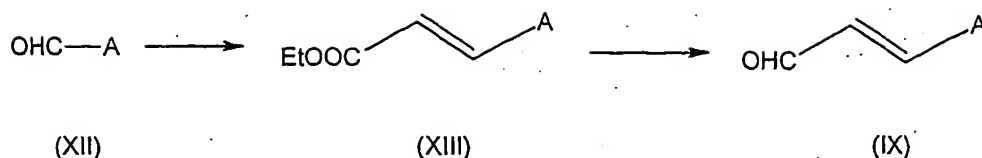


Schéma F

La (+)-hydroxypinanone est un produit commercial, de même que l'amino-2 acétate d'éthyle. La réaction est effectuée en présence de  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$  dans un solvant aromatique, tel que le benzène ou le toluène par exemple, de préférence au reflux du solvant.

Le composé de formule (IX) peut être aisément préparé par des moyens bien connus de l'homme du métier, notamment en suivant le schéma de synthèse G décrit ci-dessous :



5

Schéma G

Le composé (XII) est traité par du triéthylphosphonoacétate d'éthyle en présence d'un hydrure mixte, de préférence un hydrure de lithium et de bore, dans un solvant anhydre, pour donner l'ester (XIII). La conversion en oléfine de configuration *trans* est quasi totale.

Le composé (XIII) est ensuite soumis à un double traitement : a) une réduction en alcool par traitement au DIBAH (di-isobutyl aluminium hydride), puis b) oxydation en aldéhyde par le chlorochromate de pyridinium.

L'invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un composé répondant à la formule (S-I) ou (I) décrite ci-dessus. Une molécule de formule (S-I) ou (I) selon l'invention, qui est dotée d'une activité de régulation de l'activité des lymphocytes NKT (orientation TH1 ou TH2, cytotoxicité, libération de cytokines), peut être utilisée pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'une maladie qui peut être choisie parmi les maladies auto-immunes, le cancer et en particulier les métastases de mélanomes localisées dans les poudrons ou le foie, les maladies infectieuses, notamment les infections par des parasites, des protozoaires, des virus et les infections bactériennes intracellulaires, le diabète, notamment le diabète de type 1, les maladies inflammatoires chroniques et aiguës. Parmi les maladies auto-immunes on peut citer en particulier l'uvéite, l'arthrite, l'athérosclérose, le lupus érythémateux, la thyroïdite d'Hashimoto, la sclérose en plaques et le diabète auto-immun. Ces composés peuvent en outre être utilisés comme agent radioprotecteur, pour prévenir ou traiter les effets pathologiques d'irradiations, telles que les irradiations par les rayons  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  les irradiations ultraviolettes ou les

irradiations par rayons X, les irradiations par des protons, des neutrons ou des faisceaux d'électrons qui sont couramment utilisés dans le traitement des cancers. Ces composés peuvent être également utilisés pour prévenir ou traiter les dégradations de la moelle osseuse, comme accélérateur de la prolifération des cellules médullaires.

- 5 Parmi les maladies infectieuses susceptibles d'être traitées par le produit selon l'invention, on peut citer notamment le SIDA, l'hépatite B et les infections à cytomégalovirus.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent également comprendre d'autres agents actifs thérapeutiques.

- 10 Les composés selon l'invention sont généralement formulés sous forme d'une composition stérile, pharmaceutiquement acceptable. Cette composition pharmaceutique peut être sous n'importe quelle forme, pourvu qu'elle soit appropriée au mode d'administration choisi. Une telle composition peut par exemple être administrée par voie parentérale, par exemple par voie intraveineuse, intramusculaire  
15 ou sous-cutanée ; elle peut être donnée oralement ou par voie nasale au moyen d'un spray, sous forme de gouttes ou de suppositoires etc.... Elle peut être formulée sous forme de solutions dans l'eau ou dans l'huile ou sous forme d'émulsions. Parmi les excipients utilisables, on peut citer : l'eau, l'alcool, les polyols, la glycérine, les huiles végétales, les agents conservateurs, les agents stabilisants, les agents solubilisants, les  
20 agents mouillants, les émulsionnants, les colorants, les sels, les tampons, les agents antioxydants.

Le dosage du composé (S-I) ou (I) selon l'invention varie en fonction de différents facteurs tels que la maladie à traiter, la voie d'administration, l'âge et le poids de l'individu à traiter.

- 25 L'invention a en outre pour objet un réactif pour l'évaluation *in vitro* de l'activité des lymphocytes NKT, caractérisé en ce qu'il renferme au moins un composé de formule (S-I) ou (I) telle que décrite précédemment.

- L'invention a également pour objet l'utilisation d'un tel réactif pour la réalisation, *in vitro*, d'un test d'évaluation de l'activité des lymphocytes NKT, ainsi  
30 que le kit mis en œuvre au cours de cette utilisation et comportant au moins un composé de formule (S-I) ou (I) telle que définie précédemment.

Ledit test d'évaluation comprend généralement les étapes suivantes :

- la préparation de suspensions cellulaires hépatiques ou spléniques à partir d'un mammifère, tel que par exemple des souris,

- l'introduction d'un composé de formule (S-I) ou (I) telles que décrites précédemment dans cet échantillon de cellules,

5                   - l'évaluation de l'activité des composés de formule (S-I) ou (I) par mesure de l'apoptose des lymphocytes NKT hépatiques ou spléniques.

L'invention a en outre pour objet l'utilisation d'un produit de formule (S-I) ou (I) pour effectuer le tri de produits actifs dans la modulation de l'activité lymphocytaire.

10                   D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture du complément de description qui suit et qui se réfère à des exemples de préparation de quinoléines substituées entrant dans le cadre de l'invention et de démonstration de leur activité biologique, ainsi qu'aux figures annexées dans lesquelles :

15                   - la Figure 1 représente la structure du produit KRN 7000 1,  
                    - la Figure 2 représente le nombre de cellules NKT mesuré après injection de 1, 5 ou 10 µg d' $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescent 4 ou de NKR 7000 1,

                    - la Figure 3 représente la distribution cellulaire et sub-cellulaire du composé  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescent 4 dans les macrophages du péritoine chez  
20 la souris;

                    - la Figure 4 représente la cytométrie d'image de cellules de rate et de foie adhérentes fluorescentes après injection intraveineuse du composé  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescent 4 chez la souris,

                    - la Figure 5 représente la localisation histologique de cellules  
25 fluorescentes sur des sections de foie de souris après injection intraveineuse du composé  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescent 4 ou du composé KRN 7000 1 chez la souris.

Il va de soi, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustrations de l'invention et n'en constituent nullement une limitation.

### 30    EXEMPLES

Les préparations détaillées ci-dessous reposent sur le principe du mode de synthèse convergent (Schéma 1). Par comparaison avec les travaux antérieurs



de T. Sakai *et al.*, (*Org. Lett.* 1999, 1, 359) l'originalité du procédé décrit ci-dessous tient à l'approche synthétique convergente, aux formes de protection, d'activation et d'introduction du bras espaceur, aux variations apportées au mode de synthèse de la D-erythro-sphingosine 6 et aux optimisations avec modifications des protocoles expérimentaux dans l'ensemble du schéma synthétique.

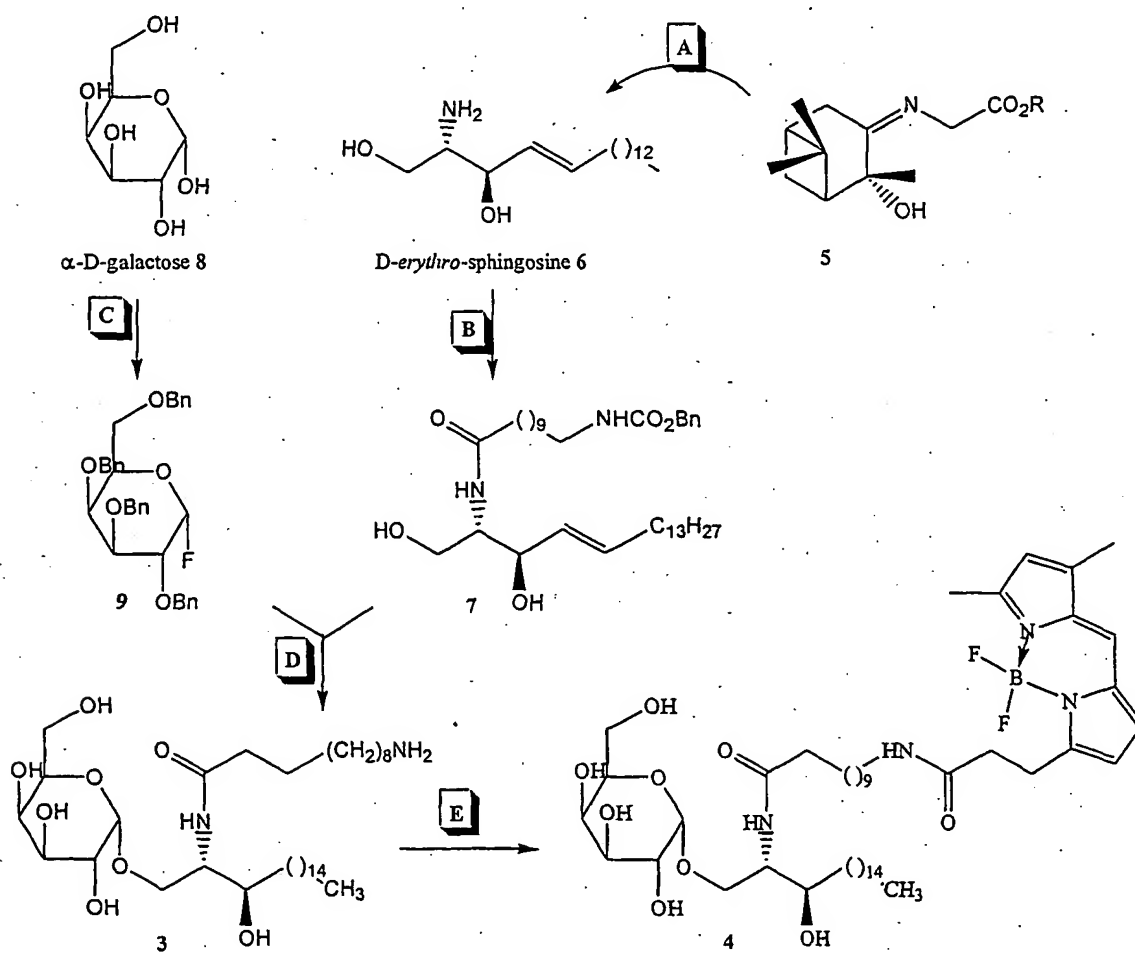


Schéma 1

Dans le schéma 1 sont décrites les quatre grandes étapes A-D du procédé selon l'invention de préparation d'un composé particulier répondant à la formule (Ia). Le composé clé de ce projet, le glycolipide 3 peut ainsi être utilisé pour réaliser une extension moléculaire *via* la fonctionnalisation de l'amine primaire. La

transformation E est un exemple de dérivation destinée à fournir de nouvelles sondes biologiquement actives.

# **I - PRÉPARATION DE L' $\alpha$ -GALACTOSIDE CÉRAMIDE 3 ET DU GLYCOLIPIDE FLUORESCENT 4 :**

## **1- Synthèse du glycolipide 4**

La méthode de synthèse employée reprend certains modes de préparation déjà connus ((a) A. Solladié-Cavallo, J. L. Koessler, *J. Org. Chem.*, 1994, 59, 3240; b) T. Sakai, O. V. Naidenko, H. Iijima, M. Kronenberg, Y. Koezuka, *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 1836). Ils ont été modifiés par souci de simplification ou d'amélioration du rendement.

### **1.1- Séquence A : Préparation de la D-erythro-sphingosine 6**

Elle s'effectue *via* une réaction d'aldolisation de l'iminoester 5 dérivant de la (+)-hydroxypinanone 13, avec le 2-(E)-hexadécenal 12 conformément à l'enseignement de A. Solladié-Cavallo, J. L. Koessler, (*J. Org. Chem.*, 1994, 59, 3240) (Schémas 2 et 3). L'aldéhyde insaturé 12 est obtenu en 3 étapes à partir du tétradécanal 10 (Schéma 2). La formation de l'ester 11 est ici réalisée à température ambiante mais pourrait être réalisée à une température plus basse (on peut prévoir de faire cette réaction entre 0°C et 30°C, préférentiellement entre 10°C et 25°C). L'ajout du tétradécanal sur l'ylure dérivé du triéthylphosphonoacétate assure alors une conversion *quasi* instantanée et pratiquement totale en oléfine *trans*. Au cours de l'oxydation de l'alcool correspondant par le chlorochromate de pyridinium, l'addition de célite au milieu réactionnel permet d'améliorer significativement le rendement en facilitant le traitement. Le rendement global sur les 3 étapes est ainsi de 35%.

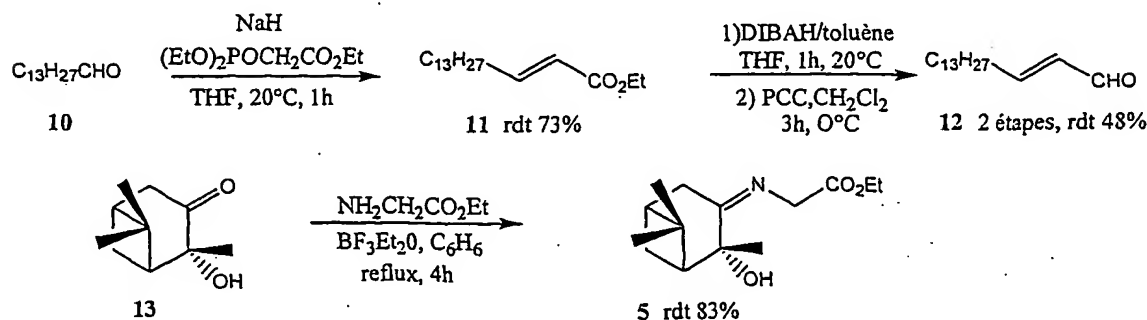


Schéma 2

En ce qui concerne l'aldolisation de l'iminoester 5, la modification du protocole consiste à remplacer le chlorotriéthoxyde de titane par son équivalent *isopropoxy*, plus facile à préparer et à utiliser (Schéma 3).

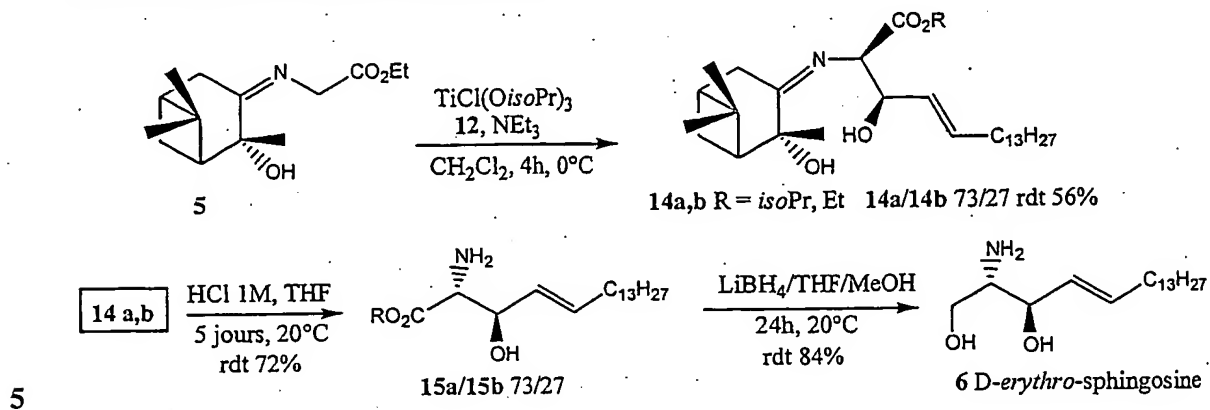


Schéma 3

On obtient alors un mélange d'esters 14a,b, l'ester *isopropylique* 14a étant nettement majoritaire. La stéréochimie des 2 centres asymétriques créés est respectée et le mélange peut être traité de la même façon que l'ester éthylique 14b dans la suite du schéma réactionnel.

Une autre amélioration majeure, par rapport aux procédés de l'art antérieur, consiste à réduire le mélange d'aminoesters 15a,b résultant de l'hydrolyse des imines 14a,b par le borohydrure de lithium en suspension dans le THF (2M). Comparativement à l'emploi du borohydrure de sodium, l'addition lente de l'hydrure est parfaitement contrôlée ce qui assure l'homogénéité du milieu réactionnel et la bonne reproductibilité des résultats.

Selon ce procédé, la *D-érythro*-sphingosine 6 est obtenue avec un rendement global de 28% par rapport à la (+)-2-hydroxy-3-pinanone commerciale 13 (Schéma 1).

### 1.2- Séquence B: Préparation du céramide 7 à fonction carbamate

Le composé 7 est obtenu *via* la condensation de la sphingosine 6 avec un ester activé 18 (Schéma 4).

26

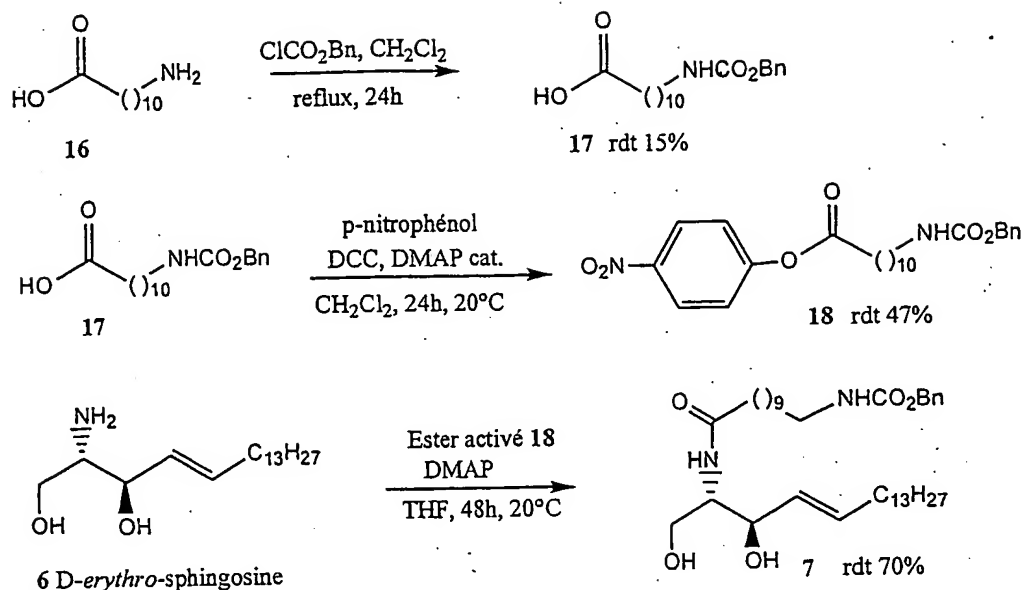


Schéma 4

- Selon un objectif synthétique proche, Sakai *et al.* (Org. Lett., 1999, 1, 359) a précédemment utilisé un dérivé trifluoroacétamide sous forme d'ester activé. Selon l'invention, la fonction amine du composé 18 est protégée sous forme de carbamate ; ce qui permet d'assurer en fin de synthèse et en une seule étape, toutes les O- et N-déprotections, ainsi que la réduction de la double liaison. L'amidification de la sphingosine 6 et la purification du céramide résultant 7 sont effectuées dans des conditions classiques.

### 1.3- Séquence C : Préparation du D-Galactose *perbenzylé* $\alpha$ -fluoré 9

La séquence réactionnelle décrite dans l'art antérieur par Nicolaou *et al.* (J. Am. Chem. Soc., 1984, 106, 4189) a été modifiée (Schéma 5).

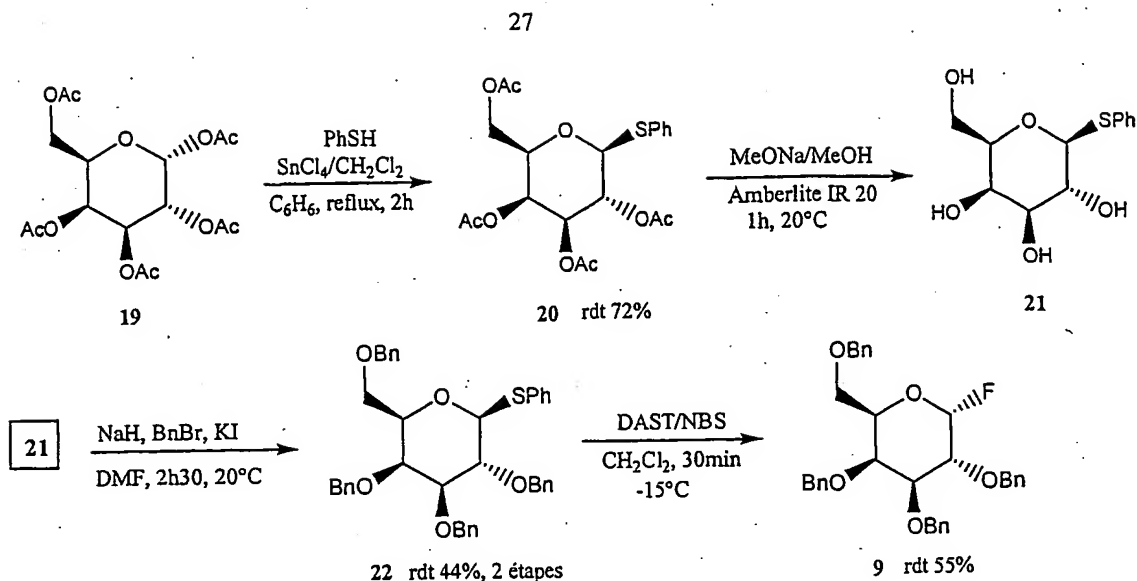


Schéma 5

- 5 L'ajout de résine amberlite acide au cours de la déprotection des acétates du dérivé 20 assure une conversion totale et permet un traitement basique
- 10 21 successif direct pour l'O-benzoylation de 21. Dans cette même réaction réalisée dans le diméthylformamide, l'addition d'une quantité *substœchiométrique* d'iodure de potassium améliore considérablement la réaction. Le rendement global de la transformation du D-galactose 8 en dérivé fluoré 9 conformément à ce procédé est de 14%.

#### 1.4- Séquence D : Obtention de l' $\alpha$ -galactocéramide 3

- 15 Pour la première étape de l'O-glycosylation, il est indispensable d'introduire dans le milieu réactionnel des microtamis pulvérulents préactivés. Un changement de solvant a du être opéré par rapport aux conditions déjà décrites sur ce type de couplage (T. Sakai, O. V. Naidenko, H. Iijima, M. Kronenberg, Y. Koezuka, J. Med. Chem., 1999, 42, 1836), (Schéma 6). Une étape de purification est nécessaire à ce stade (chromatographie sur silice).

28

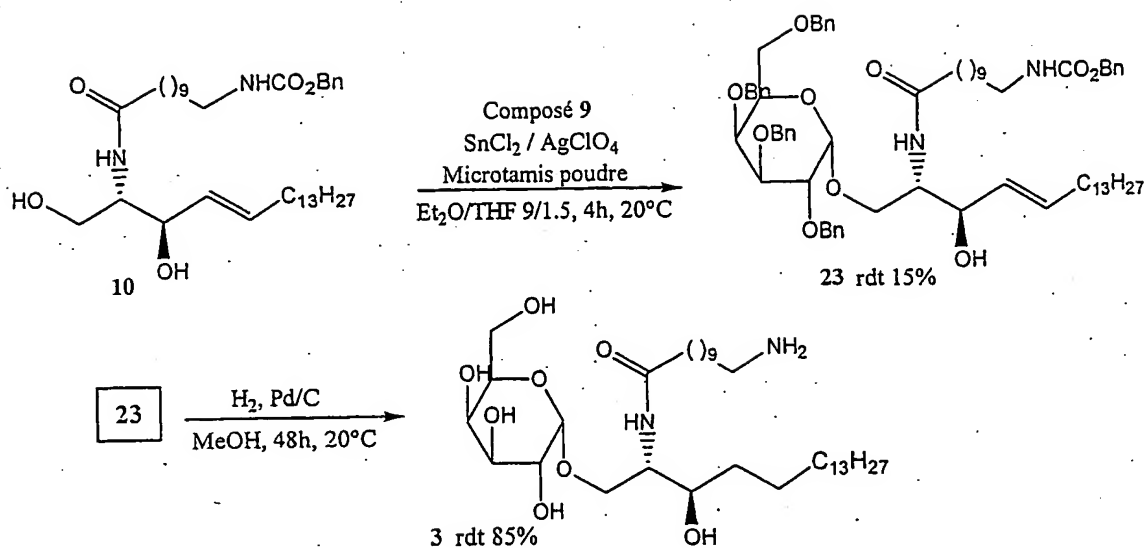


Schéma 6

5. La deuxième réaction est conduite sous atmosphère d'hydrogène en présence d'un catalyseur palladié. Elle assure la conversion directe en glycolipide 3 cherché. Les problèmes de solubilité de ce dérivé nécessitent d'utiliser un gradient de mélange dichlorométhane / méthanol pour sa purification sur silice.

#### 1.5- Séquence E : Obtention du glycolipide fluorescent 4

10. Cette étape finale nécessite une simple agitation des deux composants 3 et 24 dans la diméthylformamide.

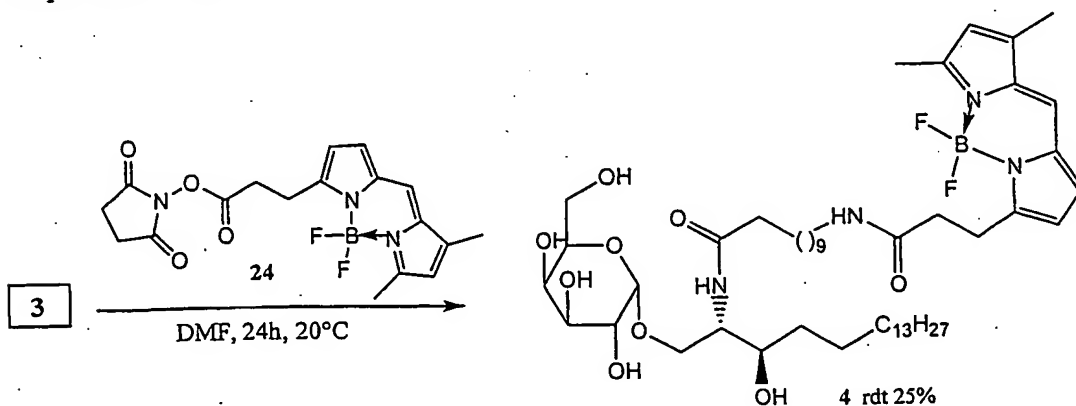


Schéma 7

Le produit final cherché 4 est directement purifié par chromatographie liquide haute performance (HPLC), (Colonne C18, gradient de solvant : (méthanol/eau).

## 2- Évaluation biologique de la sonde fluorescente 4

- 5                    Testée dans des conditions expérimentales similaires à celles utilisées pour des  $\alpha$ -galactosylcéramides, cette sonde montre une activité équivalente à celle du composé KRN 7000 décrite par Y. Osman, *et al.*, Eur. J. Immunol., 2000, 30, 1919.

## II- DONNÉES EXPÉRIMENTALES :

- 10                    1- GENERALITES SUR LES METHODES DE SEPARATION ET D'ANALYSE

Les solvants sont purifiés et séchés par distillation en présence de  $\text{LiAlH}_4$  pour le tétrahydrofurane (THF), de sodium et de benzophénone pour l'éther diéthylique ( $\text{Et}_2\text{O}$ ), en présence de pentachlorure de phosphore pour le  
15                    dichlorométhane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), en présence d'hydru de calcium pour le méthanol, l'acétonitrile et le toluène.

Les chromatographies sur couche mince (CCM) sont réalisées sur plaques de silicagel de 0,2 mm d'épaisseur 60-F-254 (Merck, Art. 5554), puis observées sous la lumière U.V. et révélées par une solution de Dragendorff (en  
20                    associant éventuellement un traitement acide pour les composés aminés) ou par une solution de permanganate de potassium.

Les séparations préparatives sont réalisées en suivant des techniques de chromatographie éclair, sous moyenne pression sur des colonnes de silice Kieselgel 60 (230-400 Mesh, Merck).

- 25                    Les spectres infrarouges (IR) sont enregistrés sur un appareil Nicolet 205 à transformée de Fourier. Les échantillons sont déposés en film sur plaque de NaCl.

Les spectres de masse (SM) par ionisation chimique ont été obtenus à l'aide d'un spectromètre NERMAG® R10-10, le gaz réactif étant l'ammoniac.

- 30                    Les spectres RMN du  $^1\text{H}$  sont enregistrés sur un appareil BRUKER® AC-300P (300,13 MHz). Les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés par rapport au tétraméthylsilane (TMS).

Les spectres RMN du  $^{13}\text{C}$  sont enregistrés sur le même appareil (75,43 MHz). Les déplacements chimiques  $\delta$  sont exprimés par rapport au chloroforme deutéré (77,14 ppm).

Les analyses et purifications par HPLC ont été réalisées sur des  
5 appareils Waters 2690 et 996 (séparation module et photodiode array detector).

## 2- MODES OPERATOIRES ET DONNEES SPECTRALES

L'ensemble des données spectrales correspondant à l'aldéhyde 12, à la D-erythrospingosine 6, à l' $\alpha$ -fluorogalactose perbenzylé 9 et à leurs précurseurs sont similaires à celles décrites dans la littérature. Ne seront présentés ici  
10 que les composés entièrement originaux.

### 2.1- Préparation de l'acide N-protégé 1

10 g (49,75 mmol) d'acide 11-amino-undécanoïque 16 et 4,25 g (25 mmol) de chloroformate de benzyle sont ajoutés à 200 mL de dichlorométhane. Le mélange est laissé sous agitation à reflux du solvant pendant une nuit. Après  
15 évaporation du solvant, le produit brut est purifié sur colonne de silice (éluant : cyclohexane 50% - AcOEt 50%) pour conduire à 2,5g de carbamate 17 pur sous forme d'un solide blanc (rendement 15%).

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1,15-1,6 (m, 16H), 2,28 (t,  $J=7,5\text{Hz}$ , 2H, H-2), 3,12 (q,  $J=6,3\text{Hz}$ , 2H, H-11), 4,62 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 5,05 (s, 1H, NH), 7,20-7,45 (m,  
20 5H, Ph).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 24,7 ; 26,7 ; 29,0 – 29,3 ; 29,8 ; 34,0 ; 41,2 ; 66,7 ( $\text{CH}_2$ ) ; 127,0 – 128,4 (CH) ; 136,5 (Cq) ; 156,5 (Cq) ; 178,1 (Cq).

### 2.2- Préparation de l'ester activé 18

A une solution de 2,5g (7,46 mmol) de carbamate 17 dans 90 mL de dichlorométhane sont ajoutés 1g (7,46 mmol) de *p*-nitrophénol, 1,54 g (7,46 mmol) de dicyclohexylcarbodiimide et 30 mg de diméthylaminopyridine. Le mélange est laissé sous agitation pendant 24 heures à température ambiante. Après évaporation du solvant, le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur colonne de silice (éluant : mélange cyclohexane / acétate d'éthyle : 70/30) pour conduire à l'ester activé  
30 18 pur sous forme de solide blanc (1,6-g, rendement 47 %).



RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1,15-1,60 (m, 16H), 2,55 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H, H-2), 3,12 (q,  $J=6,3$  Hz, 2H, H-11), 4,95 (s large, 1H, NH), 5,10 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ph}$ ), 7,20 (d,  $J=9,1$  Hz, 2H, arom.), 7,30 (m, 5H, arom.), 8,20 (d,  $J=9,1$  Hz, 2H, arom.).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 24,4 ; 26,6 ; 28,9 – 29,3 ; 29,8 ; 34,2 ; 41,0 ;  
 5 66,4 ( $\text{CH}_2$ ) ; 122,3 ; 125,0, 127,9, 128,4 (CH) ; 136,7 ; 145,1 ; 155,4 (Cq) ; 156,5 (Cq) ; 171,2 (Cq).

### 2.3- Préparation du céramide 7

A une solution de 110 mg (0,37 mmol) de sphingosine 6 et 170 mg (0,37 mmol) d'ester activé 18 dans 15 mL de THF sont additionnés 5 mg de  
 10 diméthylaminopyridine. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 48h. Après évaporation du solvant, le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur colonne de silice (éluant : mélange dichlorométhane/méthanol 95 / 5) pour conduire au céramide 7 pur sous forme de cire blanche (160 mg, rendement 70%).

15 SM (IC) : 617

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0,90 (t,  $J=6$  Hz, 3H, Me), 1,2 – 1,65 (m, 30H), 1,80 (m, 1H, OH), 2,07 (q,  $J=7$  Hz, 2H, H-6), 2,25 (t,  $J=7,5$  Hz, 2H), 3,10 (m, 1H, OH), 3,18 (q,  $J=6,5$  Hz, 2H), 3,7 (m, 1H), 3,95 (m, 2H), 4,30 (m, 1H), 4,80 (m, 1H, NH), 5,11 (s, 2H), 5,52 (dd,  $J=15,3$  ; 6,4 Hz, 1H), 5,75 (dt,  $J=15,3$  ; 6,6 Hz, 1H), 6,35  
 20 (d,  $J=7$  Hz, 1H, NH), 7,35 (m, 5H, arom.).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 14,2 ( $\text{CH}_3$ ) ; 22,8 ; 25,7 ; 26,7 ; 29,2 ; 29,7 ; 30,0 ; 32,0 ; 32,4 ; 36,9 ; 41,2 ( $\text{CH}_2$ ) ; 54,7 (CH) ; 62,6 (CH) ; 66,7 ( $\text{CH}_2$ ) ; 74,6 ( $\text{CH}_2$ ) ; 127,2 (CH) ; 128,6-128,9 (CH arom.) ; 134,2 (CH) ; 156,5 (Cq) ; 174,1 (Cq).

Analyse élémentaire pour  $\text{C}_{37}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_5$  ;

%	C	H	N
Calculée	72,04	10,46	4,54
Trouvée	71,91	10,67	4,38

### 25 2.4- Préparation de l' $\alpha$ -galactosyl-céramide protégé 23

A 3 ml d'éther diéthylique fraîchement distillés et placés sous argon sont ajoutés 80 mg (0,15 mmol) du glycoside fluoré 9 puis 350 mg de microtamis 4Å préalablement activés. Sont ensuite introduits 60,5 mg (0,30 mmol) de perchlorate

d'argent, 55,4 mg (0,30 mmol) de chlorure d'étain puis 60 mg (0,097 mmol) de céramide 7 dans 3,5 mL d'un mélange Et<sub>2</sub>O / THF (3/0,5). Le mélange est laissé sous agitation pendant 4 heures à température ambiante puis dilué avec 10 ml d'acétone. Après 15 minutes d'agitation, le milieu réactionnel est filtré sur célite. Après évaporation du solvant, le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur colonne de silice (éluant : mélange cyclohexane/acétate d'éthyle 80/20) pour conduire au composé 23 pur sous forme de cire blanche (30 mg, rendement 27%).

RMN <sup>1</sup>H (δ, CDCl<sub>3</sub>) : 0,87 (t, J=6,8 Hz, 3H, Me), 1,20 – 1,60 (m, 42H), 1,95 (m, 2H), 2,12 (td, J=7,4 ; 2,4 Hz, 2H), 3,17 (q, J=6,6 Hz, 2H), 3,50 (m, 2H), 3,68 (dd, J=10,5 ; 3,8 Hz, 1H), 3,75 – 3,88 (m, 3H), 3,95 (m, 2H), 4,03 (dd, J=9,9 ; 3,6 Hz, 1H), 4,13 (m, 1H), 4,35 ; 4,45 (2d, J=11,7 Hz, 2H), 4,55 ; 4,90 (2d, J=11,4 Hz, 2H), 4,20 ; 4,85 (2d, J=11,1 Hz, 2H), 4,73 (m, 3H), 5,10 (s, 2H), 5,42 (dd, J=15,4 ; 5,4 Hz, 1H), 5,66 (dt, J=16,4 ; 6,7 Hz, 1H), 6,38 (d, J=8,1 Hz, 1H, NH), 7,30 (m, 5H, arom.).

RMN <sup>13</sup>C (δ, CDCl<sub>3</sub>) : 14,2 (Me) ; 22,8 ; 25,7 ; 26,7 ; 29,2-29,9 ; 31,9 ; 32,4 ; 36,7 ; 41,1 (CH<sub>2</sub>) ; 52,8 (CH) ; 66,7 (CH<sub>2</sub>) ; 68,7 (CH<sub>2</sub>) ; 69,1 (CH<sub>2</sub>) ; 69,8 (CH) ; 72,7 ; 73,4 ; 74,0 ; 74,5 (CH<sub>2</sub>) ; 74,2 ; 74,8 (CH) ; 75,9 ; 79,3 ; 99,1 (CH) ; 127,4-128,5 (CH arom.) ; 129,2 (CH ène) ; 133,0 (CH ène) ; 136,7 ; 137,7 ; 138,1 ; 138,4 ; 138,5 (Cq) ; 156,4 (Cq) ; 173,2 (Cq).

## 2.5- Préparation de l'α-galactosyl-céramide 3

Une solution de l'α-galactosylcéramide 23 (30 mg, 0,046 mmol) est préparée à partir d'un mélange de 4 ml de méthanol et de 2 ml de tétrahydrofurane. Après addition de 30 mg de palladium sur charbon à 5 %, le mélange est agité 3 jours à température ambiante sous atmosphère d'hydrogène. Le milieu réactionnel est ensuite filtré sur célite et le résidu solide lavé avec du chloroforme. Après distillation des solvants, le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur silice (mélange dichlorométhane/méthanol 98/2 puis mélange 95/5). Le composé 3 est ainsi obtenu pur sous forme d'une cire blanche (16 mg, rendement 85 %).

MS (IC) 647

RMN <sup>1</sup>H (δ, CD<sub>3</sub>OD) : 0,8 (t, 3H, Me), 1,11-1,61 (m, 44H), 2,05 (m, 2H), 2,70 (m, 2H), 3,5-3,85 (m, 10H), 4,8 (d, J=3 Hz, 1H), 7,2 (d, J=8 Hz, 1H, NH).

RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 24,2 ( $\text{CH}_3$ ) ; 27,0 – 32,4 ; ( $\text{CH}_2$ ) ; 37,7 ( $\text{CH}_2$ ) ; 41,2 ( $\text{CH}$ ) ; 48,3 ( $\text{CH}_2$ ) ; 55,8 ( $\text{CH}$ ) ; 63,2 ( $\text{CH}_2$ ) ; 68,7 ( $\text{CH}_2$ ) ; 70,7-72,8 ; 101,6 ( $\text{CH}$ ) ; 176,6 ( $\text{Cq}$ ).

## 2.6- Préparation de l' $\alpha$ -galactosyl-céramide-BODIPY® 4

- 5 7 mg (0,011 mmol) d' $\alpha$ -galactosyl-céramide 3 sont dissous dans 0,5 ml de diméthylformamide (DMF). Après introduction de l'ester activé 24 (5 mg, 0,011 mmol dissous dans 0,2 ml de DMF), le mélange est agité pendant 36 heures sous atmosphère inerte. Après évaporation du solvant, le produit brut est purifié
- 10 C18, méthanol puis gradient méthanol/eau, 80/20). On isole ainsi 2,5 mg d'un solide rouge (rendement 25 %) qui doit être conservé au froid ( $-20^\circ\text{C}$ ) et à l'abri de la lumière.

MS (FAB)  $\text{M}+23$  : 943

- Masse exacte, Analyse Haute Résolution 943,6107 pour
- 15  $\text{C}_{49}\text{H}_{83}\text{O}_9\text{N}_4\text{F}_2\text{BNa}$

RMN  $^1\text{H}$  ( $\delta$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) : 0,8 (t,  $J=6$  Hz, 3H, Me), 1,20-1,60 (3m, 44H), 2,15 (m, 2H), 2,30 (s, 3H), 2,50 (s, 3H), 2,60 (m, 2H), 3,05-3,15 (m, 2H), 3,40-3,90 (5m, 8H), 6,20 (s large, 1H), 6,30 (s large, 1H), 7,0 (s large, 1H), 7,40 (s large, 1H).

- 20 III- Mise en évidence de l'activité biologique du produit fluorescent  $\alpha$ -galactosylcéramide 4

### 3.1 Matériel et méthodes

Les souris C57BL/6 utilisées sont âgées de 6 à 8 semaines et sont fournies par IFFA-Credo (L'Arbresle, France).

- 25 La sonde fluorescente  $\alpha$ -galactosylcéramide 4 (1, 5, 10 ou 50  $\mu\text{g}$  dans 150 ml d'une solution PBS 0,025% Tween® 20) ou le véhicule seul (PBS 0,025% Tween® 20) sont injectés par voie intrapéritonéale. Les souris sont sacrifiées 15 heures après l'injection.

Préparation des suspensions cellulaires :

Elles sont préparées à partir du foie des souris injectées. Les cellules du foie sont résuspendues dans une solution isotonique de Percoll à 80 % (Pharmacia, Uppsala, Suède) puis sont recouvertes avec une solution isotonique de Percoll à 40 %.

Une centrifugation pendant 20 minutes à 3000 tours/min permet de concentrer les cellules mononucléées à l'interface 40-80 %. Les cellules collectées sont enfin lavées une fois avec une solution de PBS.

Marquage et analyse en cytométrie de flux :

Les anticorps sont fournis par PharMingen (San Diego, CA, USA). Les cellules sont pré-incubées pendant 10 minutes avec des anticorps anti-FCγIII/II (Fcblock, 2.4G2), puis elles sont exposées pendant 15 minutes aux anticorps anti-TCRαβ-FITC (H57-597) et NK1.1-PE (PK136). Après un lavage les cellules sont résuspendues dans une solution de PBS et analysées par cytométrie de flux au moyen d'un appareil FACS Calibur® BD Becton Dickinson 5San Jose, CA, USA).

Résultats :

La proportion relative de lymphocytes NK1.1<sup>+</sup> et TCRαβ<sup>+</sup> du foie est évaluée par analyse en cytométrie de flux :

- souris témoin :  $23,65 \pm 10,26$
- souris traitée :  $1,13 \pm 0,54$

Aucune différence significative n'est trouvée entre les proportions relatives de ces lymphocytes (NK1.1<sup>+</sup> et TCRαβ<sup>+</sup>) préparées à partir des souris traitées par 1,5 ou 10 µg de la sonde fluorescente 4.

Tout d'abord, l'activité biologique de la molécule α-galactosylcéramide 4 a été testée *in vivo* et comparée à celle du produit KRN 7000 1 dont la structure est représentée sur la Figure 1. En tant que réactif pour l'activation *in vivo* des cellules NKT, le témoin (KRN 7000 1) est habituellement injecté intrapéritonéalement sous forme d'une suspension dans 0,5% de Tween® 20 (polysorbate) dans le PBS. Ce test est fondé sur la propriété qu'ont les α-galactosylcéramides à induire l'apoptose des cellules NKT de foie et de rate, restreintes par la molécule CD1d1, dans les heures qui suivent l'injection intrapéritonéale.

**3.2 Influence du KRN 7000 1 et du α-galactosylcéramide BODIPY® 4 sur le nombre des cellules NKT**

1, 5 ou 10  $\mu\text{g}$  du dérivé  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescent 4 a été injecté intrapéritonéalement, tandis que des concentrations identiques de KRN 7000 1 ont été injectées à titre de contrôle. Les monocytes du foie ont été isolés selon la méthode décrite ci-dessus et analysés à la recherche de cellules NK1.1+ TCR  $\alpha\beta$  int+ par analyse en cytométrie de flux.

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 2 annexée sur laquelle le nombre de cellules NKT est exprimé en fonction de la concentration d' $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescent 4 ou de KRN 7000 1 injectée en  $\mu\text{g}$ .

Ces résultats montrent qu'une quantité injectée aussi faible que 1  $\mu\text{g}$  de la molécule  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescente 4 est capable d'induire la disparition de presque toutes les cellules NKT du foie, tout comme le témoin KRN 7000 1. Il est remarquable que les cellules restantes NK1.1+ TCR  $\alpha\beta$  int+ ne sont pas restreintes à la molécule CD1d1 et ne répondent donc pas à la définition originale des cellules NKT. La molécule  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescente 4 conforme à l'Invention possède donc une activité comparable à celle de KRN 7000 1 dans le test d'apoptose *in vivo* et dans cette gamme de concentrations.

### 3.3 Capture des cellules après injection intra-péritonéale

Dans un second temps, on a recherché les premières cellules ayant capturé le composé fluorescent après injection intra-péritonéale de 10  $\mu\text{g}$  du composé  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescent 4. Les cellules du péritoine ont été récupérées par lavage de la cavité péritonéale et la recherche du composé marqué fluorescent a été effectuée.

Les résultats obtenus sont représentés sur la Figure 3 annexée sur laquelle est représentée la distribution cellulaire et sub-cellulaire du composé  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescent 4 dans les macrophages du péritoine.

Ces résultats montrent qu'une heure après l'injection presque tous les macrophages ont fourni une réponse positive à la recherche de fluorescence ; le marquage étant soit constitué de taches discrètes le long de la membrane soit situé dans des vésicules dans le cytoplasme. Ces résultats montrent également que le marqueur se lie à un récepteur, et que le complexe migre ensuite vers la membrane où il est absorbé.

Des monocytes ont été récupérés du foie et de la rate des souris auxquelles on avait administré le marqueur  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescent 4 de façon intra-péritonéale. Les cellules adhérentes et non-adhérentes ont été récupérées séparément et analysées à la recherche d'un marquage. Aucune cellule marquée n'a pu être détectée dans aucun des deux organes. Ceci montre que la molécule  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescente 4 a été majoritairement capturée par les macrophages du péritoine. On peut formuler deux hypothèses expliquant l'activité biologique observée sur le foie soit par le fait qu'une quantité indétectable de cette molécule échappe à la capture par le péritoine et migre jusqu'au foie et aux organes périphériques, soit par le fait que des macrophages ayant absorbé la molécule migrent jusqu'au foie où ils libèrent le composé  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescent 4. Cette hypothèse est soutenue par l'observation qui a pu être faite que des macrophages du péritoine lavés et réinjectés par voie intraveineuse peuvent induire une activation dans ces organes.

#### 3.4 Etude de la capture cellulaire après injection par voie intraveineuse

Dans un troisième temps, on a recherché quelles étaient les cellules susceptibles de capturer le composé  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescent 4 après injection intraveineuse de 50  $\mu$ g de ce produit chez des souris. Les monocytes du foie et de la rate ont été isolés une heure après l'injection et les cellules adhérentes ont été séparées des cellules non-adhérentes. La fraction des cellules répondant positivement a été déterminée par cytométrie d'image. Les résultats sont exposés sur la Figure 4.

Ces résultats montrent qu'environ 10 % des cellules adhérentes ont donné une réponse positive dans les deux organes avec une localisation sub-cellulaire similaire à celle observée dans les macrophages du péritoine. Les cellules non-adhérentes (NK, NKT et les lymphocytes) ont donné une réponse négative : elles n'avaient pas absorbé de quantité significative de la molécule marquée. La localisation du marqueur fluorescent dans le foie a été examinée à l'aide d'un microscope à fluorescence et de sections congelées contre-marquées à l'aide de bleu d'Evans, et également par microscopie confocale en utilisant un contre-marquage à la rhodamine-phalloïdine-PI. Les résultats de ces essais sont exposés sur la Figure 5.

Ces résultats montrent qu'aucun marquage des hépatocytes n'a pu être noté, de même qu'aucun marquage des cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins. Par leur apparence et leur localisation dans les sinusoides, les cellules marquées sont assimilées à des macrophages ou à des cellules adhérentes, pouvant être des cellules de Kupffer. Le marqueur fluorescent est stocké dans des vésicules, de la même façon que dans les macrophages du péritoine, certaines des particules étant situées près du noyau.

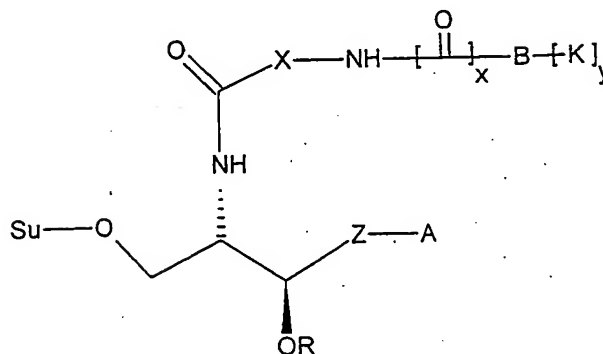
Par conséquent, on peut en déduire que le composé  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescent 4 conforme à l'Invention ne se comporte pas de la même façon en fonction du mode d'injection employé. Bien qu'une fraction des molécules injectées dans le péritoine atteignent le foie (directement ou indirectement par l'intermédiaire des macrophages), ce qui explique l'activité biologique observée, la plus grande partie du produit injecté dans le péritoine reste stockée dans les macrophages du péritoine.

Au contraire, le produit injecté par voie intraveineuse a été retrouvé massivement dans les cellules de type cellule de Kupffer dans le foie et dans les APC ou "Antigen Presenting Cells" (cellules dendritiques et probablement macrophages) de la rate.

Finalement, toutes les cellules n'ayant pas été atteintes par le composé  $\alpha$ -galactosylcéramide fluorescent 4, on peut conclure à l'existence d'une spécificité dans la capture des composés de type  $\alpha$ -galactosylcéramides conduisant à leur intégration en quantités significatives dans les APC.

## REVENDICATIONS

1. Dérivé  $\alpha$ -glycosylcéramide répondant à la formule générale (S-I)



5

(S-I)

dans laquelle :

- Su représente un résidu choisi parmi les glycosides et les dérivés de glycoside ;
- 10 - X représente un radical alcane di-yle en  $C_1$ - $C_{30}$ , linéaire ou ramifié ou un groupement aryle ;
- x est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- y est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- A représente un atome d'hydrogène ; un groupement alkyle en  $C_1$ - $C_{20}$  linéaire ou ramifié ou un groupement aryle ;
- 15 - Z représente  $-CH_2-CH_2-$  ou  $-CH=CH-$  ;
- R représente un atome d'hydrogène ou un résidu glycoside qui peut être identique ou différent du radical Su ;
- B représente un groupement choisi parmi : un atome d'hydrogène, et alors  $x=y=0$  ;
- 20 ou B représente un groupement choisi parmi : une simple liaison, un radical alkyle, alcényle ou alcynyle en  $C_1$ - $C_{30}$ , linéaire, ramifié ou cyclique, éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements  $-OH$ ,  $-NH_2$ , halogène,  $-COOH$ ,  $-CONH_2$ , par un groupement aryle éventuellement substitué ou par un groupement hétéroaryle, par un hétérocycle comprenant de 5 à 10 chaînons et un
- 25 ou plusieurs hétéro atomes choisis parmi O, N, S ; un groupement aryle

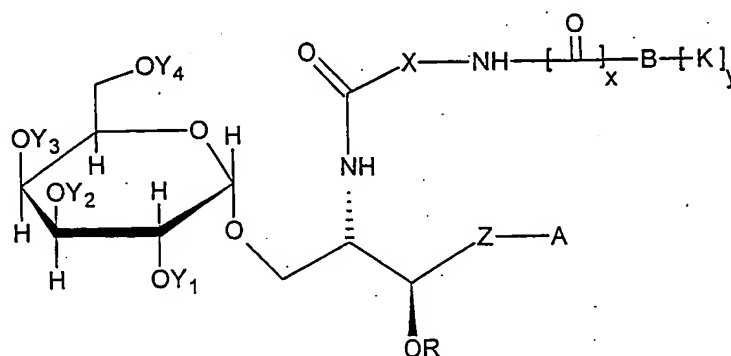


éventuellement substitué ou un groupement hétéroaryle, un hétérocycle comprenant de 5 à 10 chaînons et un ou plusieurs hétéro atomes choisis parmi O, N, S ; une chaîne peptidique ou pseudopeptidique.

- K représente un groupement pharmacophore.

5

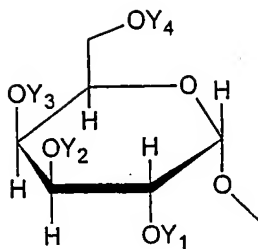
2. Dérivé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est un  $\alpha$ -galactosylcéramide répondant à la formule générale (I) :



(I)

dans laquelle :

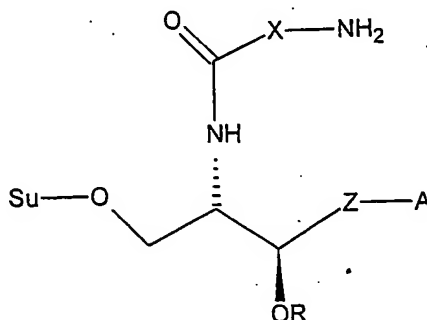
- 10 -  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  et  $Y_4$  représentent un atome d'hydrogène, un groupement benzyle ou un monosaccharide ;
- X représente un radical alcane di-yle en  $C_1$ - $C_{30}$ , linéaire ou ramifié ou un groupement aryle ;
- x est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- 15 - y est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- A représente un atome d'hydrogène ; un groupement alkyle en  $C_1$ - $C_{20}$  linéaire ou ramifié ou un groupement aryle ;
- Z représente  $-CH_2-CH_2-$  ou  $-CH=CH-$  ;
- R représente un atome d'hydrogène ou un radical  $\alpha$ -galactosyle répondant à la
- 20 formule (II) ci-dessous :



(II)

- 5 dans laquelle  $Y_1, Y_2, Y_3, Y_4$  ont les mêmes définitions que celles indiquées ci-dessus dans la formule (I),
- B représente un groupement choisi parmi : un atome d'hydrogène, et alors  $x=y=0$  ;  
ou B représente un groupement choisi parmi : une simple liaison, un radical alkyle, alcényle ou alcynyle en  $C_1-C_{30}$ , linéaire, ramifié ou cyclique, éventuellement substitué par un ou plusieurs groupements  $-OH, -NH_2$ , halogène,  $-COOH, -CONH_2$ , par un groupement aryle éventuellement substitué ou par un groupement hétéroaryle, par un hétérocycle comprenant de 5 à 10 chaînons et un ou plusieurs hétéro atomes choisis parmi O, N, S ; un groupement aryle éventuellement substitué ou un groupement hétéroaryle, un hétérocycle comprenant de 5 à 10 chaînons et un ou plusieurs hétéro atomes choisis parmi O, N, S ; une chaîne peptidique ou pseudo-peptidique.
  - K représente un groupement pharmacophore.

3. Dérivé selon la revendication 1, caractérisé en ce que  $x=y=0$  et  $B=H$  et en ce qu'il répond à la formule (S-Ia) :

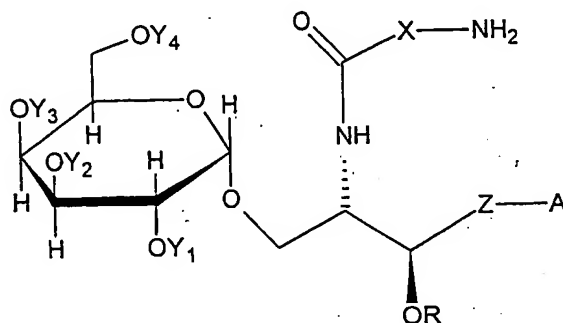


(S-Ia)

dans laquelle

- Su représente un résidu choisi parmi les glycosides et les dérivés de glycoside ;
- X représente un radical alcane di-yle en  $C_1-C_{30}$ , linéaire ou ramifié ou un groupement aryle ;
- 5 - A représente un atome d'hydrogène ; un groupement alkyle en  $C_1-C_{20}$  linéaire ou ramifié ou un groupement aryle ;
- Z représente  $-CH_2-CH_2-$  ou  $-CH=CH-$  ;
- R représente un atome d'hydrogène ou un résidu glycoside qui peut être identique ou différent du radical Su.

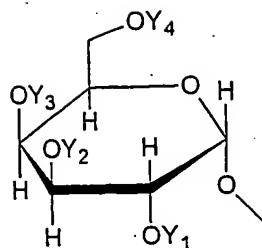
- 10 4. Dérivé selon la revendication 2, caractérisé en ce que  $x=y=0$  et  $B=H$  et en ce qu'il répond à la formule (Ia) :



(Ia)

- 15 dans laquelle :

- Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub> et Y<sub>4</sub> représentent un atome d'hydrogène, un groupement benzyle ou un monosaccharide ;
- X représente un radical alcane di-yle en  $C_1-C_{30}$ , linéaire ou ramifié ou un groupement aryle ;
- 20 - A représente un atome d'hydrogène ; un groupement alkyle en  $C_1-C_{20}$  linéaire ou ramifié ou un groupement aryle ;
- Z représente  $-CH_2-CH_2-$  ou  $-CH=CH-$  ;
- R représente un atome d'hydrogène ou un radical  $\alpha$ -galactosyle répondant à la formule (II) ci-dessous :



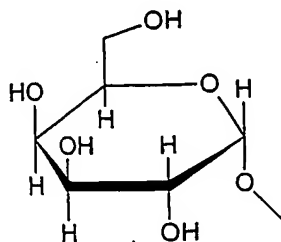
(II)

- 5 dans laquelle  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$  ont les mêmes significations que celles indiquées ci-dessus dans la formule (Ia).

5. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que dans la formule (S-I) ou dans la formule (I) l'une ou plusieurs des conditions ci-dessous sont remplies :

- 10 -  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$  et  $Y_4$  représentent l'atome d'hydrogène ;  
 - X représente un radical alcane di-yle, en  $C_6$ - $C_{15}$ , linéaire ou ramifié ou un groupement aryle ;  
 - x est un entier égal à 0 ou à 1 ;  
 - y est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- 15 - A représente : un groupement alkyle en  $C_4$ - $C_{15}$ , linéaire ou ramifié ou un groupement aryle ;  
 - Z représente  $-CH_2-CH_2-$  ou  $-CH=CH-$  ;  
 - R représente un atome d'hydrogène ou un radical  $\alpha$ -galactosyle :

20



- B représente un groupement choisi parmi : l'atome d'hydrogène, et alors  $x=y=0$ , ou B représente un groupement alkyle ou alcényle en  $C_1$ - $C_{12}$ , linéaire ou ramifié.

6. Dérivé selon la revendication 5, caractérisé en ce que dans la formule (S-I) ou dans la formule (I) l'une ou plusieurs des conditions ci-dessous sont remplies :

- $Y_1, Y_2, Y_3$  et  $Y_4$  représentent l'atome d'hydrogène ;
- 5 - X représente un radical alcane di-yle en  $C_6-C_{15}$ , linéaire ou ramifié ;
- x est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- y est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- A représente : un groupement alkyle en  $C_4-C_{15}$ , linéaire ou ramifié ;
- Z représente  $-CH_2-CH_2-$  ou  $-CH=CH-$  ;
- 10 - R représente un atome d'hydrogène ou un radical  $\alpha$ -galactosyle ;
- B représente un groupement choisi parmi : un atome d'hydrogène et alors  $x=y=0$ , ou B représente un groupement alkyle en  $C_1-C_{12}$ , linéaire ou ramifié.

7. Dérivé selon la revendication 6, caractérisé en ce que dans la formule (S-I) ou dans la formule (I) l'une ou plusieurs des conditions ci-dessous sont

15 remplies :

- $Y_1, Y_2, Y_3$  et  $Y_4$  représentent l'atome d'hydrogène ;
- X représente un radical alcane di-yle linéaire en  $C_6-C_{15}$  ;
- x est égal à 1 ;
- y est un entier égal à 0 ou à 1 ;
- 20 - A représente : un groupement alkyle linéaire en  $C_{10}-C_{15}$  ;
- Z représente  $-CH_2-CH_2-$  ;
- R représente un atome d'hydrogène ;
- B représente un groupement choisi parmi : un atome d'hydrogène, et alors  $x=y=0$ ,
- 25 ou B représente un groupement alkyle linéaire en  $C_1-C_6$ .

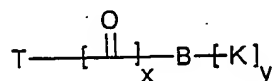
8. Dérivé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que dans la formule (S-I) ou dans la formule (I) :

- $y=1$  ;
- K représente un groupement pharmacophore choisi parmi : le dipyrrométhène
- 30 difluorure de bore, le nitrobenzoxadiazole, les groupements à fonction azirine, les groupements hétérocycliques iodés, les groupements radioactifs et les groupements dansyle.

9. Dérivé selon la revendication 8, caractérisé en ce que dans la formule (S-I) ou dans la formule (I) :

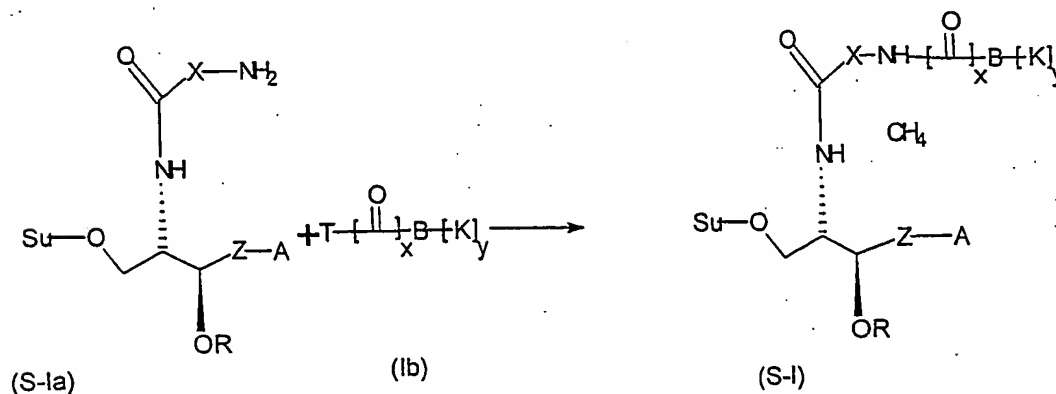
- $y=1$  ;
- K représente un groupement dipyrrométhène difluorure de bore.

5 10. Procédé de préparation d'un dérivé répondant à la formule (S-I) selon la revendication 1 dans laquelle  $x=1$  ou  $y=1$ , et  $B \neq H$ , ce procédé étant caractérisé en ce que l'on fait réagir un composé répondant à la formule (S-Ia) selon la revendication 3, dans laquelle les paramètres Su, X, Z et A ont la même signification que celle indiquée dans la formule (S-I), avec un composé répondant à la formule (Ib) ci-dessous :



(Ib)

15 dans laquelle x, y, B et K ont la même signification que celle indiquée dans la formule (S-I) et T est choisi pour réaliser l'alkylation ( $x=0$ ) ou l'acylation ( $x=1$ ) de la fonction amine libre de (S-Ia), suivant le schéma S-E ci-dessous :

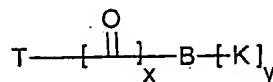


20

#### Schéma S-E

11. Procédé de préparation d'un dérivé répondant à la formule (I) selon la revendication 2 dans laquelle  $x=1$  ou  $y=1$ , et  $B \neq H$ , ce procédé étant caractérisé en ce que l'on fait réagir un composé répondant à la formule (Ia) selon la

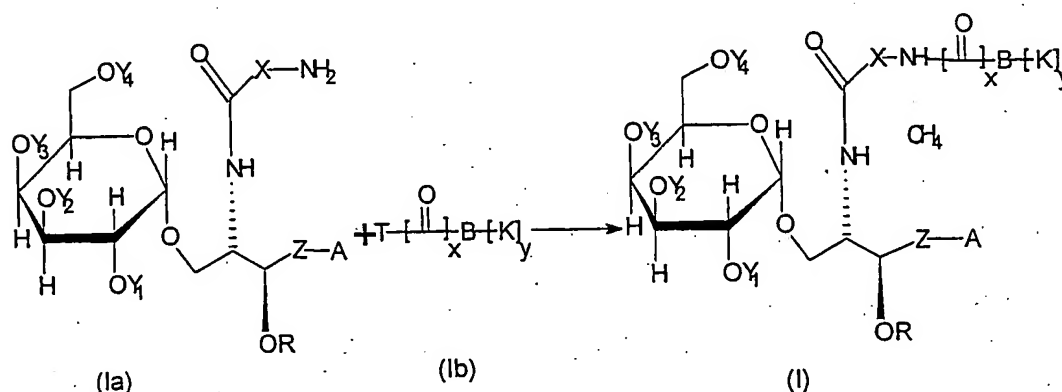
revendication 2, dans laquelle les paramètres  $Y_1$ ,  $Y_2$ ,  $Y_3$ ,  $Y_4$ ,  $X$ ,  $Z$  et  $A$  ont la même signification que celle indiquée dans la formule (I), avec un composé répondant à la formule (Ib) ci-dessous :



5

(Ib)

dans laquelle  $x$ ,  $y$ ,  $B$  et  $K$  ont la même signification que celle indiquée dans la formule (I) et  $T$  est choisi pour réaliser l'alkylation ( $x=0$ ) ou l'acylation ( $x=1$ ) de la fonction amine libre de (Ia), suivant le schéma E ci-dessous :

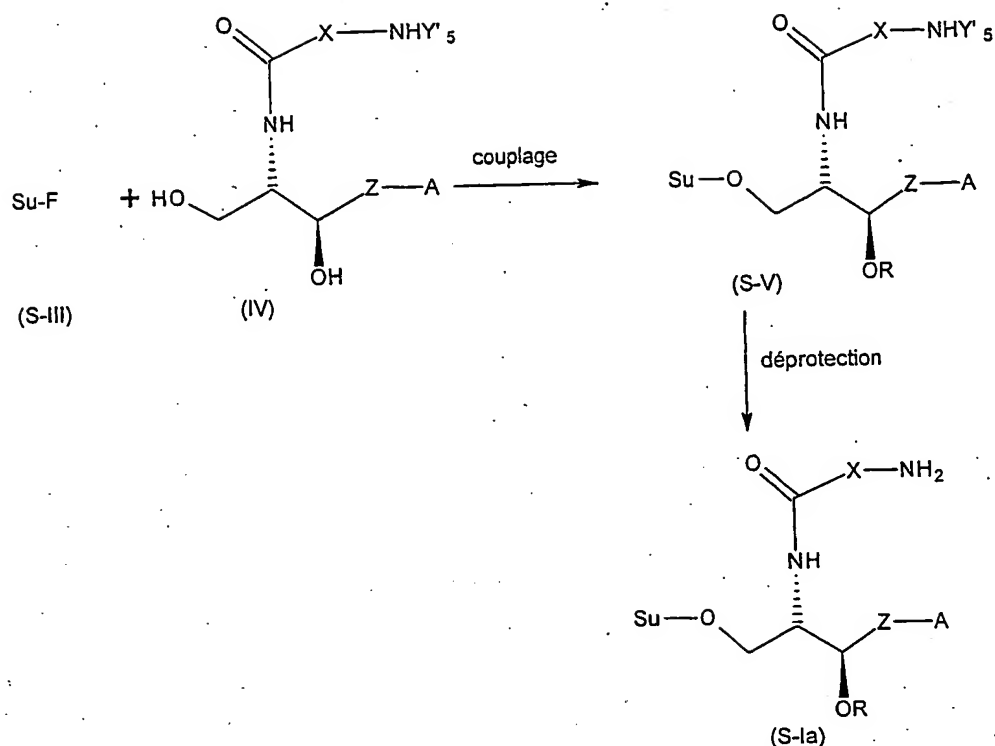


10

### Schéma E

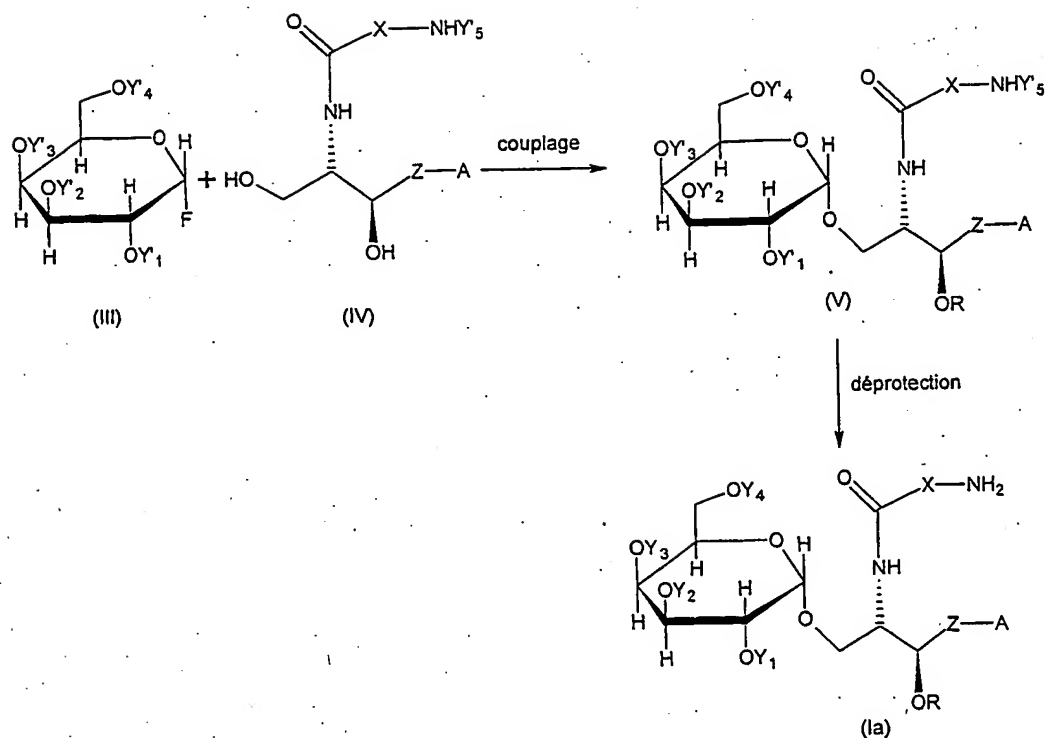
12. Procédé selon la revendication 10 caractérisé en ce que le composé répondant à la formule (S-Ia), est préparé par un procédé comportant au moins une étape au cours de laquelle on fait réagir un  $\alpha$ -glycoside répondant à la formule (S-III) dans laquelle  $Su$  a la même signification que dans la formule (S-I), avec un céramide répondant à la formule (IV) dans laquelle  $Y_3$  représente un groupement protecteur des amines ;  $Z$  représente le groupement  $-\text{CH}=\text{CH}-$  ou  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  ;  $X$  et  $A$  ont la même définition que dans la formule (S-I), cette étape de couplage étant suivie par une étape de déprotection des groupements fonctionnels selon le schéma S-D :

20

Schéma S-D

13. Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que le
- 5 composé répondant à la formule (Ia), est préparé par un procédé comportant au moins une étape au cours de laquelle on fait réagir un  $\alpha$ -galactoside répondant à la formule (III) dans laquelle  $\text{Y}'_1$ ,  $\text{Y}'_2$ ,  $\text{Y}'_3$  et  $\text{Y}'_4$  représentent un groupement protecteur des hydroxyle ou un monosaccharide protégé par des groupements protecteurs appropriés, avec un céramide répondant à la formule (IV) dans laquelle  $\text{Y}'_5$  représente un
- 10 groupement protecteur des amines ; Z représente le groupement  $-\text{CH}=\text{CH}-$  ou  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$  ; X et A ont la même définition que dans la formule (I), cette étape de couplage étant suivie par une étape de déprotection des groupements fonctionnels selon le schéma D :



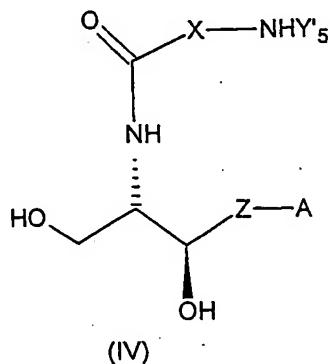


### Schéma D

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>, Y<sub>4</sub> et Y<sub>5</sub> sont choisis de façon à pouvoir être ôtés simultanément en une seule étape.

15. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que Y<sub>1</sub>, Y<sub>2</sub>, Y<sub>3</sub>, Y<sub>4</sub> et Y<sub>5</sub>, sont choisis parmi les groupements benzyle et benzyloxycarbonyle.

16. Produit répondant à la formule (IV) :



10 dans laquelle :

- A représente : un atome d'hydrogène ; un groupement alkyle en C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>, linéaire ou ramifié ou un groupement aryle ;

- X représente un radical alcane di-yle, en C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>, linéaire ou ramifié ou un groupement aryle ;
- Z représente -CH=CH- ;
- Y'<sub>5</sub> est un groupement benzyloxycarbonyle.

5 17. Produit selon la revendication 16, caractérisé en ce que :

- A représente : un groupement alkyle linéaire en C<sub>10</sub>-C<sub>15</sub> ;
- X représente un radical alcane di-yle linéaire en C<sub>6</sub>-C<sub>15</sub> ;
- Z représente -CH=CH- ;
- Y'<sub>5</sub> représente un groupement benzyloxycarbonyle.

10 18. Procédé selon la revendication 12 ou la revendication 13, caractérisé en ce que le produit répondant à la formule (IV) est préparé par réaction d'un dérivé activé répondant à la formule (VI) dans laquelle W représente un groupe activateur avec un analogue ou un dérivé de la D-érythro-sphingosine répondant à la formule (VII) ou avec la D-érythro-sphingosine, suivant le schéma B ci-dessous :

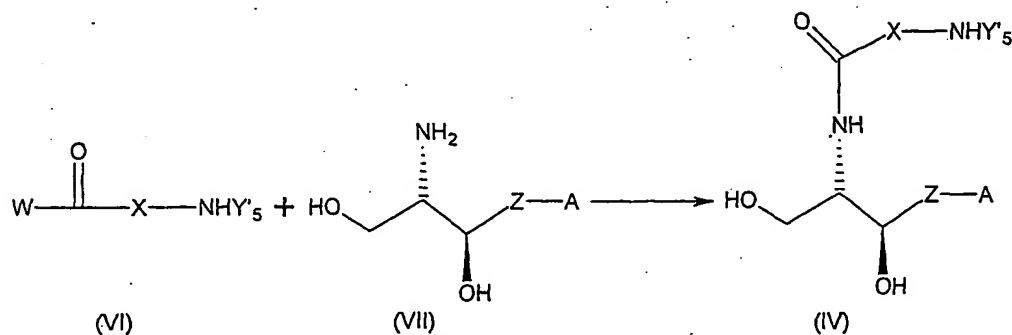


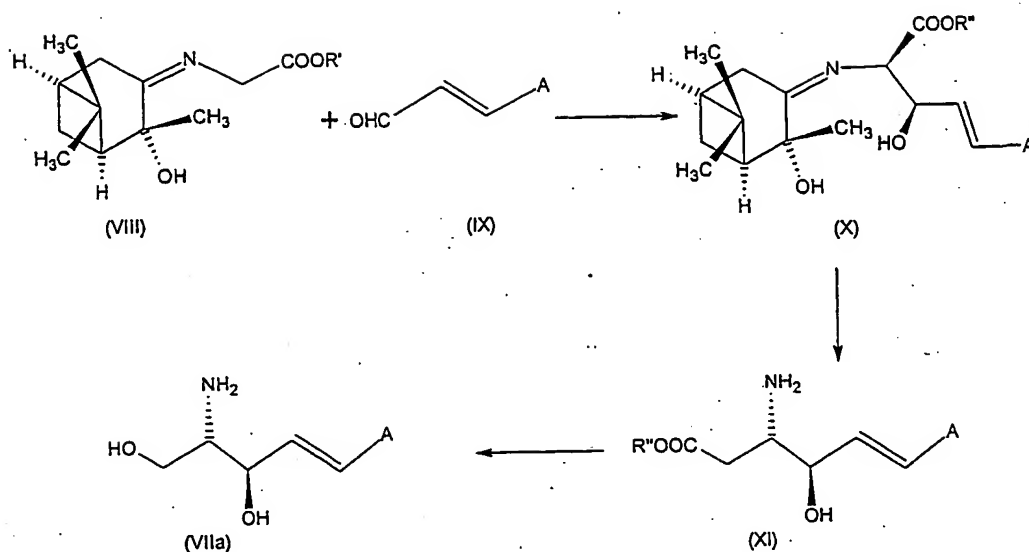
Schéma B

dans lequel X, Y'<sub>5</sub>, Z et A ont la même définition que dans la formule (IV).

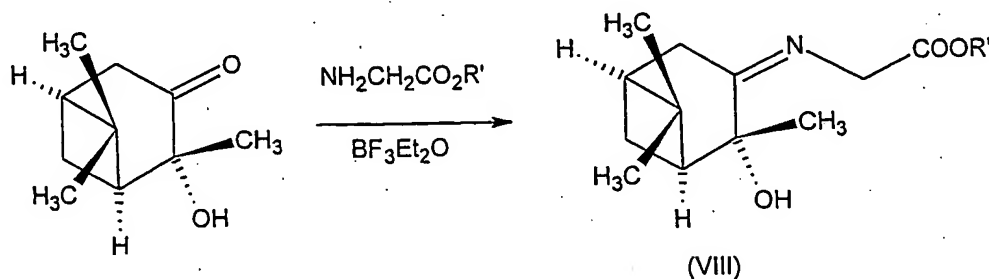
19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que le composé répondant à la formule (VIIa), est obtenu par réaction d'un iminoester répondant à la formule (VIII) dans laquelle le radical R' représente un radical éthyle et R'' représente un radical éthyle ou isopropyle avec l'aldéhyde répondant à la formule (IX) via une réaction d'aldolisation pour donner le composé (X) puis que l'imine (X) est ensuite hydrolysée en amine (XI) et la fonction ester de (XI) est réduite en alcool (VII) suivant le schéma A ci-dessous :

20

49

Schéma A

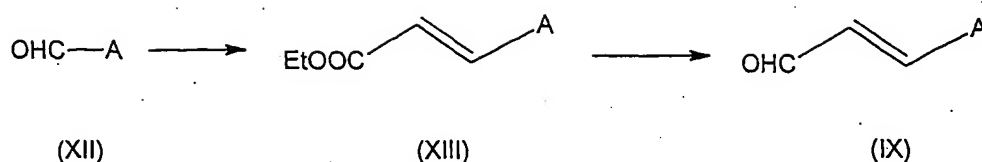
20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le composé répondant à la formule (VIII) est préparé par réaction de la (+)-hydroxypinanone avec l'amino-2 acétate d'éthyle, en présence de  $\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$  dans un solvant aromatique, de préférence au reflux du solvant, conformément au schéma de synthèse F ci-dessous :

Schéma F

dans lequel  $\text{R}'$  représente un radical éthyle.

21. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que le composé répondant à la formule (IX) est préparé par réaction du composé (XII) par du triéthylphosphonoacétate d'éthyle en présence d'un hydruire mixte de lithium et de bore, dans un solvant anhydre, pour donner l'ester (XIII), qui est ensuite soumis à un double traitement : a) une réduction en alcool par traitement au DIBALH, puis b) oxydation en aldéhyde par le chlorochromate de pyridinium, suivant le schéma de synthèse G décrit ci-dessous :

50

Schéma G

22. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle  
 5 comprend au moins un composé répondant à la formule (S-I) selon la revendication 1 dans un support pharmaceutiquement acceptable.

23. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle  
 comprend au moins un composé répondant à la formule (I) selon la revendication 2 dans un support pharmaceutiquement acceptable.

10

24. Utilisation d'un composé de formule (S-I) ou de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, pour la préparation d'un médicament destiné à la régulation de l'activité des lymphocytes NKT.

25. Utilisation d'un composé de formule (S-I) ou de formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'une maladie qui peut être choisie parmi les maladies auto-immunes, le cancer, les maladies infectieuses, le diabète, notamment le diabète de type 1, les maladies inflammatoires chroniques et aiguës.

26. Utilisation selon la revendication 25, caractérisée en ce que le  
 20 médicament est destiné au traitement d'une maladie choisie parmi : l'arthrite, l'athérosclérose, le lupus érythémateux, la thyroïdite d'Hashimoto, la sclérose en plaques, et le diabète auto-immun.

27. Réactif pour l'évaluation *in vitro* de l'activité des lymphocytes NKT, caractérisé en qu'il renferme au moins un composé de formule (S-I) ou de  
 25 formule (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

28. Utilisation d'un réactif selon la revendication 27, pour la réalisation, *in vitro*, d'un test d'évaluation de l'activité des lymphocytes NKT.

29. Utilisation selon la revendication 28, caractérisée par le fait que ledit test comprend les étapes suivantes :

- la préparation de suspensions cellulaires hépatiques ou spléniques à partir d'un mammifère,
  - l'introduction d'un composé de formule (S-I) ou (I) dans cet échantillon de cellules,
  - 5 - l'évaluation de l'activité des composés de formule (S-I) ou (I) par mesure de l'apoptose des lymphocytes NKT hépatiques ou spléniques.
30. Utilisation selon la revendication 28 ou 29, pour effectuer le tri de produits actifs dans la modulation de l'activité lymphocytaire.
31. Kit pour la mise en œuvre d'un test *in vitro* d'évaluation de
- 10 l'activité des lymphocytes NKT, caractérisé en ce qu'il comporte au moins un composé de formule (S-I) ou (I) selon l'une quelconque des revendications 1 à 9.

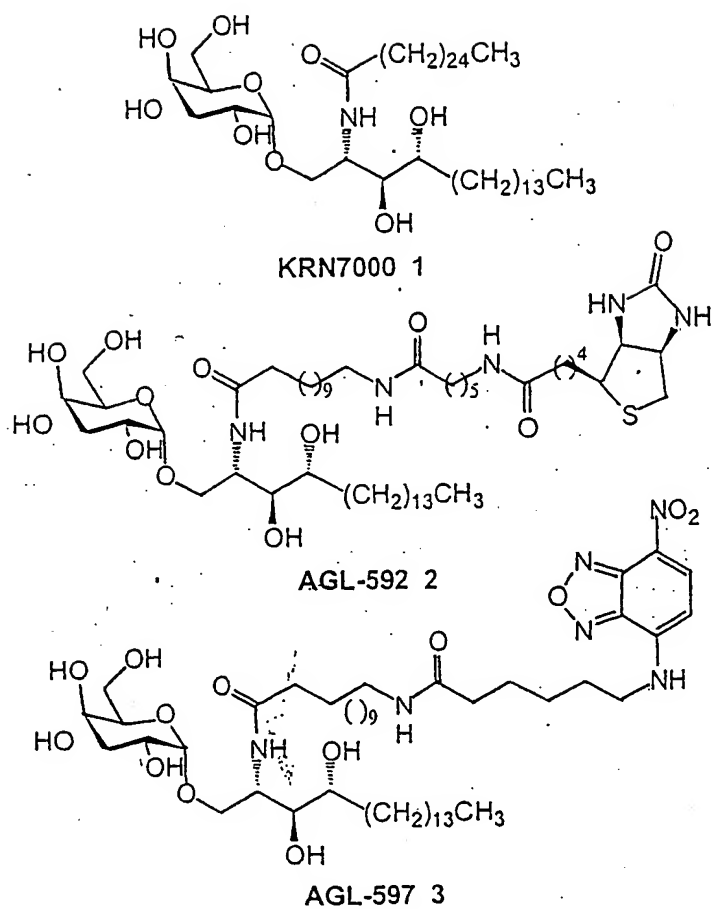


Figure 1.

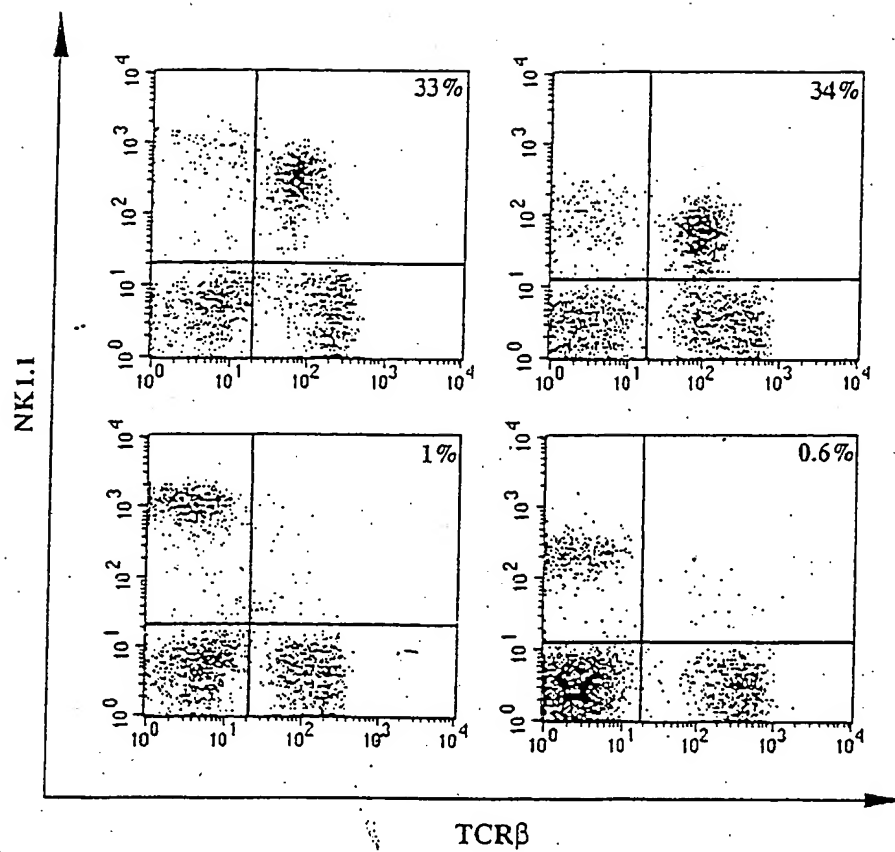


Figure 2

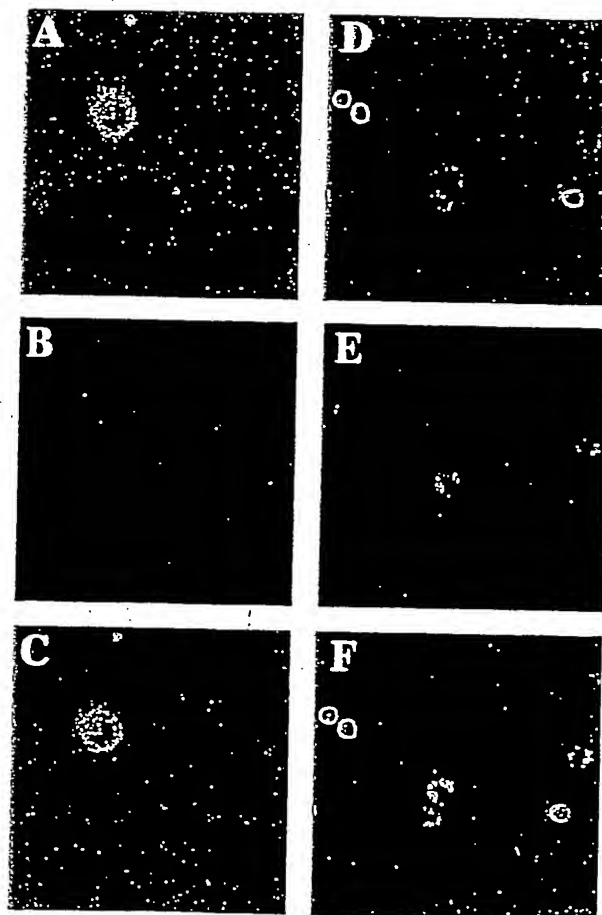


Figure 3



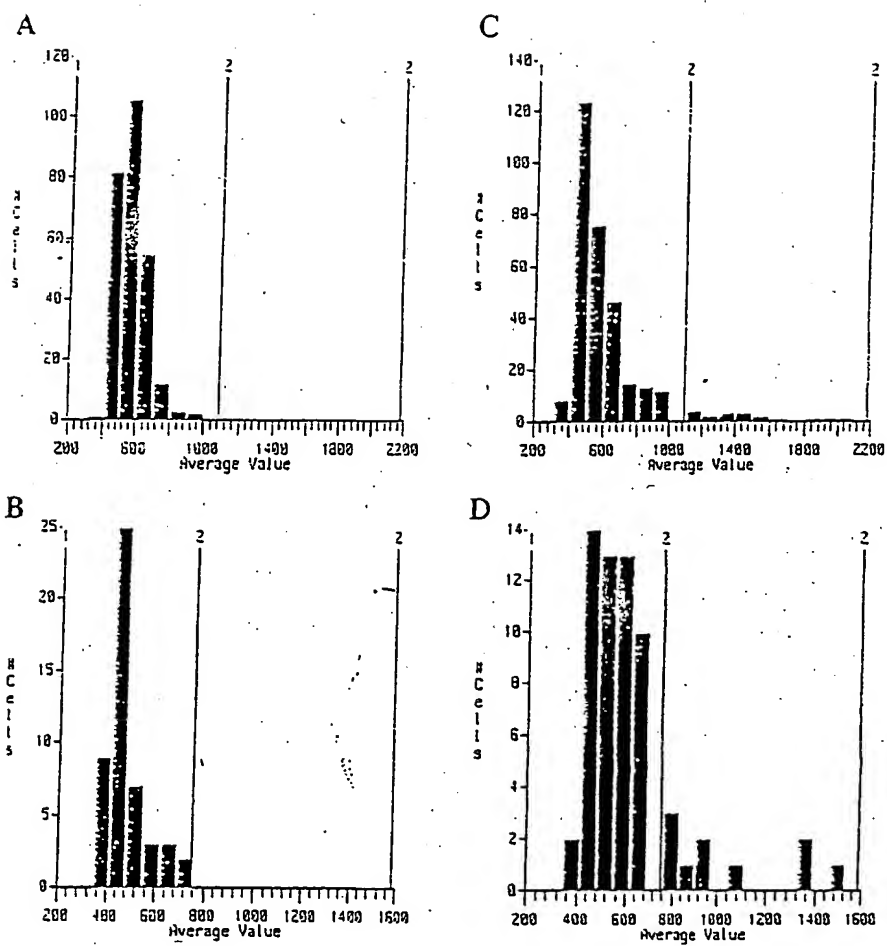


Figure 4

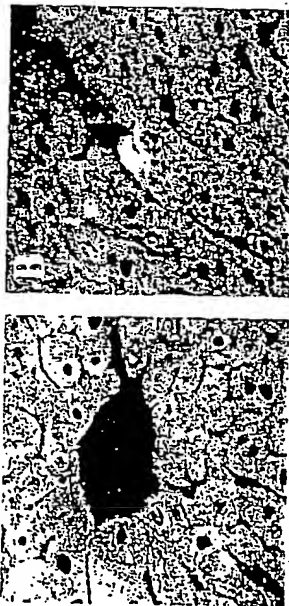


Figure 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/01362

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07H15/10 C07H15/04 A61K31/70 A61P37/00 A61P35/00  
C07C271/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07H A61K A61P C07C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 373 038 A (FIDIA SPA) 13 June 1990 (1990-06-13) revendications 11-13, 15, 16, 24 et 58; page 10, lignes 10-11 ---	1, 3, 5-7, 22
A	EP 0 988 860 A (KIRIN BREWERY) 29 March 2000 (2000-03-29) cited in the application the whole document ---	1, 10, 16, 22, 24, 25, 27, 31
A	EP 0 957 161 A (KIRIN BREWERY) 17 November 1999 (1999-11-17) cited in the application the whole document ---	1, 10, 16, 22, 24, 25, 27, 31
	---	
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 September 2003

Date of mailing of the international search report

12/09/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Fitz, W

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No

PCT/FR 03/01362

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 765 883 A (DAIKIN IND LTD) 2 April 1997 (1997-04-02)  the whole document ----	1,10,16, 22,24, 25,27,31
A	WEISS, BENJAMIN ET AL: "Synthesis of mono-, di, and tripeptidyl amides of dihydrosphingosine" J. CHEM. ENG. DATA (1968), 13(3), 450-1, XP008008929 page 450, table 1, mentions 1 et 3; page 451, table 2, mentions 1 et 3 ----	1,10,16, 22,24, 25,27,31
A	WO 01.72701 A (TANG HSIN YI YVETTE ;ALI SHAUKAT (US); MAYHEW ERIC (US); JANOFF AN) 4 October 2001 (2001-10-04) page 33, exemple 12; page 35: composés avec Boc-Norvalanine, NH <sub>2</sub> -Leucine, Boc-Leucine, Boc-Norleucine; page 37, composés avec Boc-a-Abu, Boc-a-Aib ----	1,10,16, 22,24, 25,27,31
A	EP 0 940 409 A (TAKARA SHUZO CO) 8 September 1999 (1999-09-08)  colonne 12, ligne 25 - colonne 13, ligne 6 ----	1,10,16, 22,24, 25,27,31
A	WO 95 32002 A (OREGON STATE) 30 November 1995 (1995-11-30)  page 28, ligne 24: aminohexanoyl sphingosine ----	1,10,16, 22,24, 25,27,31
A	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; SUGIMOTO, HIROHIKO ET AL: "Preparation of sphingosine derivatives as antitumor agents" retrieved from STN Database accession no. 112:56573 XP002215363 abstract -& JP 01 093562 A (SHIONOGI AND CO., LTD., JAPAN) 12 April 1989 (1989-04-12) page 475, table 1, composé 8; page 476, table 3, composé 13 ----	1,10,16, 22,24, 25,27,31
A	EP 0 072 286 A (FIDIA SPA) 16 February 1983 (1983-02-16)  page 7, product 1 -----	1,10,16, 22,24, 25,27,31

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat Application No

PCT/FR 03/01362

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0373038	A	13-06-1990	IT 1235162 B	22-06-1992
			AT 149506 T	15-03-1997
			AU 632771 B2	14-01-1993
			AU 4566489 A	21-06-1990
			CA 2004190 A1	02-06-1990
			DE 68927821 D1	10-04-1997
			DE 68927821 T2	25-09-1997
			DK 589789 A	03-06-1990
			EP 0373038 A2	13-06-1990
			HU 209561 B	28-07-1994
			HU 52107 A2	28-06-1990
			JP 2200691 A	08-08-1990
			JP 3004297 B2	31-01-2000
			NO 894819 A	05-06-1990
			NZ 231590 A	23-12-1992
			US 5792858 A	11-08-1998
			US 5519007 A	21-05-1996
EP 0988860	A	29-03-2000	AU 742253 B2	20-12-2001
			AU 6748598 A	30-10-1998
			EP 0988860 A1	29-03-2000
			CN 1259872 T	12-07-2000
			WO 9844928 A1	15-10-1998
			US 2003139351 A1	24-07-2003
			US 6531453 B1	11-03-2003
EP 0957161	A	17-11-1999	AU 741035 B2	22-11-2001
			AU 7891398 A	31-07-1998
			EP 0957161 A1	17-11-1999
			CN 1247564 A	15-03-2000
			WO 9829534 A1	09-07-1998
EP 0765883	A	02-04-1997	JP 7309888 A	28-11-1995
			AU 688503 B2	12-03-1998
			AU 2454795 A	18-12-1995
			EP 0765883 A1	02-04-1997
			US 5773596 A	30-06-1998
			CA 2190722 A1	30-11-1995
			WO 9532211 A1	30-11-1995
WO 0172701	A	04-10-2001	AU 5519901 A	08-10-2001
			CA 2402769 A1	04-10-2001
			EP 1268414 A1	02-01-2003
			WO 0172701 A1	04-10-2001
EP 0940409	A	08-09-1999	AU 718171 B2	06-04-2000
			AU 3461897 A	10-02-1998
			EP 0940409 A1	08-09-1999
			US 2002086410 A1	04-07-2002
			CA 2260768 A1	29-01-1998
			CN 1230964 A	06-10-1999
			WO 9803529 A1	29-01-1998
			JP 10081655 A	31-03-1998
WO 9532002	A	30-11-1995	US 5543390 A	06-08-1996
			AU 2639395 A	18-12-1995
			EP 0759784 A1	05-03-1997
			US 6063759 A	16-05-2000

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat<sup>a</sup> Application No

PCT/FR 03/01362

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9532002	A	WO 9532002 A1	30-11-1995
		US 5543391 A	06-08-1996
		US 6339060 B1	15-01-2002
		US 5840674 A	24-11-1998
JP 1093562	A 12-04-1989	JP 2588729 B2	12-03-1997
EP 0072286	A 16-02-1983	IT 1171432 B	10-06-1987
		AT 23165 T	15-11-1986
		AU 561811 B2	21-05-1987
		AU 8672682 A	10-02-1983
		DE 3273983 D1	04-12-1986
		DK 346282 A ,B,	04-02-1983
		EP 0072286 A1	16-02-1983
		ES 8501735 A1	01-03-1985
		ES 8602616 A1	16-03-1986
		ES 8608480 A1	01-12-1986
		FI 822672 A ,B,	04-02-1983
		GR 76234 A1	04-08-1984
		HU 192771 B	28-07-1987
		IE 53644 B1	04-01-1989
		JP 5058976 A	09-03-1993
		JP 5012329 B	17-02-1993
		JP 58043942 A	14-03-1983
		KR 8800042 B1	20-02-1988
		MX 156355 A	12-08-1988
		NO 822631 A ,B,	04-02-1983
		NZ 201439 A	21-02-1986
		PL 237756 A1	07-05-1985
		PT 75363 A ,B	01-09-1982
		US 4897381 A	30-01-1990
		US 4897382 A	30-01-1990
		US 4757053 A	12-07-1988
		YU 73485 A1	28-02-1986
		YU 73585 A1	28-02-1986
		YU 168982 A1	28-02-1986
		ZA 8205585 A	29-06-1983

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07H15/10 C07H15/04 A61K31/70 A61P37/00 A61P35/00  
C07C271/22

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07H A61K A61P C07C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 373 038 A (FIDIA SPA) 13 juin 1990 (1990-06-13) revendications 11-13, 15, 16, 24 et 58; page 10, lignes 10-11	1, 3, 5-7, 22
A	EP 0 988 860 A (KIRIN BREWERY) 29 mars 2000 (2000-03-29) cité dans la demande le document en entier	1, 10, 16, 22, 24, 25, 27, 31
A	EP 0 957 161 A (KIRIN BREWERY) 17 novembre 1999 (1999-11-17) cité dans la demande le document en entier	1, 10, 16, 22, 24, 25, 27, 31
	---	
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

\*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

\*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

\*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

\*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

\*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&amp;\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 septembre 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

12/09/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Fitz, W

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>EP 0 765 883 A (DAIKIN IND LTD) 2 avril 1997 (1997-04-02)</p> <p>le document en entier</p> <p>---</p>	1,10,16, 22,24, 25,27,31
A	<p>WEISS, BENJAMIN ET AL: "Synthesis of mono-, di, and tripeptidyl amides of dihydrosphingosine" J. CHEM. ENG. DATA (1968), 13(3), 450-1, XP008008929 page 450, table 1, mentions 1 et 3; page 451, table 2, mentions 1 et 3</p> <p>---</p>	1,10,16, 22,24, 25,27,31
A	<p>WO 01 72701 A (TANG HSIN YI YVETTE ;ALI SHAUKAT (US); MAYHEW ERIC (US); JANOFF AN) 4 octobre 2001 (2001-10-04) page 33, exemple 12; page 35: composés avec Boc-Norvalanine, NH<sub>2</sub>-Leucine, Boc-Leucine, Boc-Norleucine; page 37; composés avec Boc-a-Abu, Boc-a-Aib</p> <p>---</p>	1,10,16, 22,24, 25,27,31
A	<p>EP 0 940 409 A (TAKARA SHUZO CO) 8 septembre 1999 (1999-09-08)</p> <p>colonne 12, ligne 25 - colonne 13, ligne 6</p> <p>---</p>	1,10,16, 22,24, 25,27,31
A	<p>WO 95 32002 A (OREGON STATE) 30 novembre 1995 (1995-11-30)</p> <p>page 28, ligne 24: aminohexanoyl sphingosine</p> <p>---</p>	1,10,16, 22,24, 25,27,31
A	<p>DATABASE CA 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; SUGIMOTO, HIROHIKO ET AL: "Preparation of sphingosine derivatives as antitumor agents" retrieved from STN Database accession no. 112:56573 XP002215363 abrégé -&amp; JP 01 093562 A (SHIONOGI AND CO., LTD., JAPAN) 12 avril 1989 (1989-04-12) page 475, table 1, composé 8; page 476, table 3, composé 13</p> <p>---</p>	1,10,16, 22,24, 25,27,31
A	<p>EP 0 072 286 A (FIDIA SPA) 16 février 1983 (1983-02-16)</p> <p>page 7, product 1</p> <p>-----</p>	1,10,16, 22,24, 25,27,31



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/01362

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0373038	A	13-06-1990	IT 1235162 B	22-06-1992
			AT 149506 T	15-03-1997
			AU 632771 B2	14-01-1993
			AU 4566489 A	21-06-1990
			CA 2004190 A1	02-06-1990
			DE 68927821 D1	10-04-1997
			DE 68927821 T2	25-09-1997
			DK 589789 A	03-06-1990
			EP 0373038 A2	13-06-1990
			HU 209561 B	28-07-1994
			HU 52107 A2	28-06-1990
			JP 2200691 A	08-08-1990
			JP 3004297 B2	31-01-2000
			NO 894819 A	05-06-1990
			NZ 231590 A	23-12-1992
			US 5792858 A	11-08-1998
			US 5519007 A	21-05-1996
EP 0988860	A	29-03-2000	AU 742253 B2	20-12-2001
			AU 6748598 A	30-10-1998
			EP 0988860 A1	29-03-2000
			CN 1259872 T	12-07-2000
			WO 9844928 A1	15-10-1998
			US 2003139351 A1	24-07-2003
			US 6531453 B1	11-03-2003
EP 0957161	A	17-11-1999	AU 741035 B2	22-11-2001
			AU 7891398 A	31-07-1998
			EP 0957161 A1	17-11-1999
			CN 1247564 A	15-03-2000
			WO 9829534 A1	09-07-1998
EP 0765883	A	02-04-1997	JP 7309888 A	28-11-1995
			AU 688503 B2	12-03-1998
			AU 2454795 A	18-12-1995
			EP 0765883 A1	02-04-1997
			US 5773596 A	30-06-1998
			CA 2190722 A1	30-11-1995
			WO 9532211 A1	30-11-1995
WO 0172701	A	04-10-2001	AU 5519901 A	08-10-2001
			CA 2402769 A1	04-10-2001
			EP 1268414 A1	02-01-2003
			WO 0172701 A1	04-10-2001
EP 0940409	A	08-09-1999	AU 718171 B2	06-04-2000
			AU 3461897 A	10-02-1998
			EP 0940409 A1	08-09-1999
			US 2002086410 A1	04-07-2002
			CA 2260768 A1	29-01-1998
			CN 1230964 A	06-10-1999
			WO 9803529 A1	29-01-1998
			JP 10081655 A	31-03-1998
WO 9532002	A	30-11-1995	US 5543390 A	06-08-1996
			AU 2639395 A	18-12-1995
			EP 0759784 A1	05-03-1997
			US 6063759 A	16-05-2000

# RAPPORT RECHERCHE INTERNATIONALE

WO 03/093287

statifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 03/PCT/FR03/01362

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9532002	A		WO 9532002 A1	30-11-1995
			US 5543391 A	06-08-1996
			US 6339060 B1	15-01-2002
			US 5840674 A	24-11-1998
JP 1093562	A	12-04-1989	JP 2588729 B2	12-03-1997
EP 0072286	A	16-02-1983	IT 1171432 B	10-06-1987
			AT 23165 T	15-11-1986
			AU 561811 B2	21-05-1987
			AU 8672682 A	10-02-1983
			DE 3273983 D1	04-12-1986
			DK 346282 A ,B,	04-02-1983
			EP 0072286 A1	16-02-1983
			ES 8501735 A1	01-03-1985
			ES 8602616 A1	16-03-1986
			ES 8608480 A1	01-12-1986
			FI 822672 A ,B,	04-02-1983
			GR 76234 A1	04-08-1984
			HU 192771 B	28-07-1987
			IE 53644 B1	04-01-1989
			JP 5058976 A	09-03-1993
			JP 5012329 B	17-02-1993
			JP 58043942 A	14-03-1983
			KR 8800042 B1	20-02-1988
			MX 156355 A	12-08-1988
			NO 822631 A ,B,	04-02-1983
			NZ 201439 A	21-02-1986
			PL 237756 A1	07-05-1985
			PT 75363 A ,B	01-09-1982
			US 4897381 A	30-01-1990
			US 4897382 A	30-01-1990
			US 4757053 A	12-07-1988
			YU 73485 A1	28-02-1986
			YU 73585 A1	28-02-1986
			YU 168982 A1	28-02-1986
			ZA 8205585 A	29-06-1983